UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ASLEY THALIA MEDEIROS SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE RESÍDUOS DE TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA EM AGRICULTORES

Recife

2023

ASLEY THALIA MEDEIROS SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE RESÍDUOS DE TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA EM AGRICULTORES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Co-orientadoras: Profª. Drª. Cheila Nataly Galindo Bedor e Profª. Drª. Leila Bastos Leal

Recife

2023

Catalogação na fonte:
Bibliotecária: Kyria Macedo, CRB4 1693

S729a Souza, Asley Thalia Medeiros
Avaliação in vitro e in vivo de resíduos de Tebuconazol e Piraclostrobina em agricultores / Asley Thalia Medeiros Souza. – 2023.
142 f. : il., tab.

Orientador: Davi Pereira de Santana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2023.
Inclui referências.

1. Agroquímicos. 2. Fungicidas Industriais. 3. Absorção Cutânea. 4. Trabalhadores Rurais. 5. Exposição Ocupacional. 6. Pele. I. Souza, Davi Pereira de (orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2024 - 132)

ASLEY THALIA MEDEIROS SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE RESÍDUOS DE TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA EM AGRICULTORES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Leila Bastos Leal

Universidade Federal de Pernambuco

Examinador Interno – Presidente

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor

Universidade Federal de Pernambuco

Examinador Interno – Presidente

Dra. Juliana Kishishita

Examinadora Externa

Aprovada em: 05/05/2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão de todas as coisas, todo meu amor e gratidão por Sua presença, graça e sustento. Sem Ti nada posso fazer.

A minha mãe, por ser a melhor que eu poderia ter. Obrigada pelo cuidado diário, amor, incentivo e conselhos, a senhora é luz na minha vida. Ao meu pai, pelo cuidado e preocupação, por se importar e comemorar minhas conquistas. A minha irmã, Anniely, por sempre me ajudar em tudo e ser minha maior defensora, sempre estarei do seu lado. A minha avó por seu jeito doce, com palavras de apoio e um abraço de carinho. A toda minha família, amo vocês.

A Saulo, meu amor, amigo, companheiro, incentivador, parceiro de todos dias e momentos, obrigada por me entender, aconselhar, enxugar minhas lágrimas, me fazer sorrir e por ter o melhor abraço do mundo. Obrigada por ser quem você é.

A meus amigos, por sempre me incentivarem, comemorarem cada conquista, estarem presentes em todos os momentos e por serem, cada um com seu jeitinho, especiais em minha vida.

Ao Prof. Dr. Davi Santana, meu orientador, agradeço pelas oportunidades, confiança, apoio e ensinamentos ao longo dos meus anos de trajetória no NUDFAC.

À Profª. Drª. Leila Leal, minha coorientadora, por ser uma "mãe científica" ao longo dessa trajetória, agradeço por todo suporte, direcionamento, oportunidades, incentivo e carinho. Obrigada por acreditar que é possível, tenho uma enorme admiração pela senhora.

Ao Prof. Dr. Danilo Bedor, pelos ensinamentos e apoio, além da parceira construída ao longo deste e de outros projetos no laboratório. Aprendo muito com o senhor, obrigada.

Agradeço a todos os colaboradores do NUDFAC pela partilha diária, ajuda nos experimentos, e torcida. Em especial a Ana e Deo, por me acolherem em Belém do São Francisco, ajudarem nas coletas e serem amigos tão queridos. A Juliana meu agradecimento pela amizade e parceria desde minha primeira IC, sua amizade torna a rotina mais leve. A Wellithom pela disponibilidade em ajudar nos meus primeiros passos nos ensaios analíticos, pela amizade e parceria além do laboratório. A Irla pela amizade, conselhos e compartilhamento de experiências na bancada e na docência.

Aos trabalhadores rurais e doadores de pele humana, de suma importância para realização do trabalho.

A FACEPE pela concessão da bolsa de financiamento e ao PPGCF-UFPE e seus funcionários.

“Tenha coragem e seja gentil”

Cinderela, Disney 2015.

RESUMO

A agricultura está entre as atividades mais essenciais de todo o mundo. Dentro desse cenário, a agricultura familiar contribui com maior parte da produção de alimentos mundial, combatendo a fome. Nas últimas décadas, o uso de agrotóxicos aumentou exponencialmente, desempenhando um papel importante no crescimento das culturas, promovendo um alto rendimento e protegendo as plantas contra pragas. Os fungicidas são uma das classes de agrotóxicos mais utilizados e atuam controlando o crescimento fúngico nas lavouras, o Tebuconazol (TBZ) e a Piraclostrobina (PIRA) são exemplos da classe. O aumento do uso de agrotóxicos levou, a um aumento na exposição a estes produtos, sendo os trabalhadores rurais os mais expostos, pois entram em contato com os agrotóxicos durante o seu transporte, mistura, carregamento e aplicação. Diante do exposto, este trabalho avaliou a permeação *in vitro* dos agrotóxicos TBZ e PIRA a partir do produto concentrado e suas diluições de uso (200 g/L, 0,2 e 0,4 mg/mL para o TBZ e 250 g/L, 0,3 e 0,5 mg/mL para a PIRA) através de pele humana, mucosa vaginal, septo nasal suínos e córnea bovina, utilizando células de difusão verticais e horizontais. Foi realizada também avaliação da biodistribuição destes produtos em estrutura oculares, utilizando olhos bovinos inteiros. Além disso, foi avaliada a exposição dérmica *in vivo*, a partir de ambos os agrotóxicos, em trabalhadores agrícolas no município de Belém do São Francisco, após 4 horas de aplicação em plantação de cebola. A quantificação de todas as amostras foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS). Nos ensaios *in vitro*, tanto através da pele humana quanto das mucosas suínas (vaginal e de septo nasal) e córnea bovina, o percentual permeado do TBZ foi maior que o da PIRA, independente das concentrações aplicadas, mesmo as quantidades de TBZ aplicadas serem menores. A avaliação em olhos inteiros evidenciou uma grande distribuição de ambos os agrotóxicos nos diferentes tecidos (córnea, íris, coroide, retina, humor vítreo) e independente do agrotóxico utilizado, quando da aplicação da diluição de menor concentração, houve uma diminuição da permeação da PIRA e TBZ no humor aquoso, após 1 e 1:30hs, respectivamente, provavelmente devido a depleção do agrotóxico sobre a córnea. Os resultados *in vivo* demonstraram os altos níveis de agrotóxicos aos quais os agricultores estão expostos, com a exposição dérmica potencial total entre 0,42-145,0 mg/pessoa/h e o fator estimado de penetração no estrato córneo (FP) entre 14,88-68,83 e 0,85- 99,72% e 23,60-71,74 e 9,99-93,79% para a TBZ e PIRA nos braços e na nuca respectivamente. A falta de paramentação adequada no desenvolvimento das atividades de aplicação de agrotóxicos foi uma constante.

Palavras-chave: agrotóxicos; absorção cutânea; agricultor familiar; pele humana; IVPT.

ABSTRACT

Agriculture is among the world's most essential activities. Within this scenario, family farming contributes to most of the world's food production, fighting hunger. In recent decades, the use of pesticides has increased exponentially, playing an important role in crop growth, promoting high yields and protecting plants against pests. Fungicides are one of the most used classes of pesticides and act by controlling fungal growth in crops, Tebuconazole (TBZ) and Pyraclostrobin (PIRA) are examples of the class. The increased use of pesticides has led to an increase in exposure to these products, with rural workers being the most exposed, as they come into contact with pesticides during transport, mixing, loading and application. Given the above, this study evaluated the in vitro permeation of the pesticides TBZ and PIRA from the concentrated product and its use dilutions (200 g/L, 0.2 and 0.4 mg/mL for TBZ and 250 g/L, 0.3 and 0.5 mg/mL for PIRA) through human skin, vaginal mucosa, porcine nasal septum and bovine cornea, using vertical and horizontal diffusion cells. An evaluation of the biodistribution of these products in ocular structures was also carried out, using whole bovine eyes. In addition, *in vivo* dermal exposure was evaluated from both pesticides in agricultural workers in the municipality of Belém do São Francisco, after 4 hours of application in an onion plantation. The quantification of all samples was performed by High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS/MS). In vitro assays, both through human skin and porcine mucous membranes (vaginal and nasal septum) and bovine cornea, the permeated percentage of TBZ was higher than that of PIRA, regardless of the concentrations applied, even though the amounts of TBZ applied were smaller. The evaluation of whole eyes showed a wide distribution of both pesticides in different tissues (cornea, iris, choroid, retina, vitreous humor) and, regardless of the pesticide used, when applying the dilution of the lowest concentration, there was a decrease in PIRA permeation and TBZ in the aqueous humor, after 1 and 1:30 hours, respectively, probably due to depletion of the pesticide on the cornea. In vivo results demonstrated the high levels of pesticides to which farmers are exposed, with total potential dermal exposure between 0.42-145.0 mg/person/hr and estimated stratum corneum (PF) penetration factor between 14.88 -68.83 and 0.85- 99.72% and 23.60-71.74 and 9.99- 93.79% for TBZ and PIRA in the arms and nape respectively. The lack of adequate attire in the development of pesticide application activities was a constant.

Keywords: pesticides; skin absorption; family farmer; human skin; IVPT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química do Tebuconazol. 29

Figura 2- Estrutura química da Piraclostrobina. 31

Figura 3- Mapa do estado de Pernambuco, destacando a cidade de Belém do São Francisco. 35

Figura 4- Exemplificação do sistema GHS de classificação. 40

Figura 5- Figura esquemática das camadas da pele e estruturas anexas. 41

Figura 6- Vias de permeação através da pele. 42

Figura 7- a) Célula de difusão de Franz. (b) Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz. 43

Figura 8- Representação esquemática da técnica de *tape-stripping*. 44

Figura 9- (a) Células de difusão *side-by-side*. (b) Representação esquemática de uma célula de difusão *side-by-side*. 44

Figura 10- Equipamento Vision ® Microette™. 57

Figura 11- Células de Franz em experimento de permeação utilizando o equipamento Vision ® Microette™. 58

Figura 12- Fragmento de pele humana após ensaio de permeação cutânea fixada com agulhas e com molde para realização de *tape stripping*. 59

Figura 13- Sistema de células de difusão horizontal, *side-by-side*. 60

Figura 14- Célula de difusão horizontal, *side-by-side*. 60

Figura 15- (A) Olhos bovinos montados em suporte e postos em incubadora (B) Olhos suínos montados em suporte e postos em incubadora 62

Figura 16- Representação da localização de fixação dos patchs de algodão nas vestimentas dos trabalhadores. 66

Figura 17- Representação da localização onde foram realizadas coletas de *tape-stripping.* ... 67

Figura 18- Espectro de massa do Tebuconazol, com identificação de massa do Q1 (íon molecular precursor) e Q3 (íon molecular do fragmento mais intenso). 71

Figura 19- Espectro de massa da Piraclostrobina, com identificação de massa do Q1 (íon molecular precursor) e Q3 (íon molecular do fragmento mais intenso). 71

Figura 20- Pico cromatográfico do Tebuconazol. 73

Figura 21- Pico cromatográfico da Piraclostrobina. 73

Figura 22- Cromatograma da análise branco de swabs secos. 74

Figura 23- Cromatograma da análise branco de swabs de álcool 74

Figura 24- Cromatograma da análise branco de fitas adesivas contendo extrato córneo. 75

Figura 25- Cromatograma da análise branco de pele humana. 75

Figura 26- Cromatograma da análise branco de mucosa vaginal suína. 75

Figura 27- Cromatograma da análise branco de córnea bovina. 76

Figura 28- Cromatograma da análise branco de humor aquoso bovino. 76

Figura 29- Cromatograma da análise branco da íris bovina. 76

Figura 30- Cromatograma da análise branco do humor vítreo bovino. 77

Figura 31- Cromatograma da análise branco da coroide bovina. 77

Figura 32- Cromatograma da análise branco da retina bovina. 77

Figura 33- Curva de calibração do Tebuconazol. 78

Figura 34- Curva de calibração da Piraclostrobina. 78

Figura 35- Distribuição do Tebuconazol e da Piraclostrobina em cada parte do sistema de difusão como resultado de 6h de exposição de Rival 200g/L e Comet 250g/L, 24h de tempo total do experimento, em pele humana (n= 6). 84

Figura 36- Perfil cumulativo de Piraclostrobina e Tebuconazol permeado (ng/ cm²) em experimento de 24 horas utilizando pele humana com aplicação de 17,7 µL das soluções diluídas dos agrotóxicos (N = 6). 84

Figura 37- Perfil cumulativo de Piraclostrobina e Tebuconazol permeado (ng/ cm²) em experimento de 24 horas utilizando pele humana com aplicação de 17,7 µL dos produtos agrotóxicos concentrados (N = 6). 85

Figura 38- Perfil cumulativo do Tebuconazol e Piraclostrobina permeado (ng/ cm²) em experimento de 8 horas utilizando mucosa vaginal suina com aplicação de 6,5uL das soluções diluídas dos agrotóxicos, respectivamente (N = 6). FT: fluxo de Tebuconazol. FP: fluxo de Piraclostrobina. 89

Figura 43- Perfil cumulativo do Tebuconazol e Piraclostrobina permeado (ng/ cm²) no humor aquoso em experimento de 2 horas utilizando olho bovino inteiro, com aplicação

de 50 uL das soluções diluídas dos agrotóxicos, respectivamente (N = 6). FT: fluxo de tebuconazol. FP: fluxo de piraclostrobina. 95

Figura 44- Retenção nas estruturas internas do olho (córnea, íris, humor vítreo, coróide e a retina), quando da aplicação de 50µL de Tebuconazol (A) e Piraclostrobina (B), nos tempos de contato de 15 minutos e 2h do experimento. 96

Figura 45- Perfil cumulativo do Tebuconazol e Piraclostrobina permeado (ng/ cm²) no humor aquoso em experimento de 2 horas utilizando olho suíno inteiro, com aplicação de 25 uL das soluções diluídas dos agrotóxicos, respectivamente (N = 6). 98

Figura 46- Retenção nas estruturas internas do olho (córnea, esclera, íris, humor vítreo e coroide), quando da aplicação de 25µL de Tebuconazol (A) e Piraclostrobina (B), nos tempos de contato de 15 minutos e 2h do experimento. 98

Figura 47- Agricultora com suas vestimentas de trabalho. 101

Figura 48- Mulheres na agricultura. 101

Figura 49- Mãe e filha na agricultura. 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das substâncias de acordo com o seu potencial irritante, segundo o teste BCOP.....65

Tabela 2- Melhores condições espectrométricas obtidas para os agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina. 70

Tabela 3- Condições da fonte de ionização. 73

Tabela 4- Dados de recuperação (%) de Tebuconazol obtidos a partir de extração das diferentes membranas biológicas com os solventes avaliado**s.** 79

Tabela 5- Dados de recuperação (%) de Piraclostrobina obtidos a partir de extração das diferentes membranas biológicas com os solventes avaliados. 80

Tabela 6- Quantidades de Tebuconazol encontradas em diferentes locais após estudo in vitro de permeação em pele humana, a partir das concentrações de 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL. 82

Tabela 7- Quantidades de Piraclostrobina encontradas em diferentes locais após estudo in vitro de permeação em pele humana, a partir das concentrações de 0,3 mg/mL e 0,5 mg/mL. 82

Tabela 8- Quantidades de Tebuconazol e Piraclostrobina encontradas em diferentes locais após estudo in vitro de permeação em pele humana, utilizando os produtos concentrados nas concentrações de 200 g/L e 250 g/L, respectivamente. 83

Tabela 9- Quantidade de Tebuconazol encontrada no estudo de permeação nas concentrações de 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL. 87

Tabela 10- Quantidade de Piraclostrobina encontrada no estudo de permeação nas concentrações de 0,3 mg/mL e 0,5 mg/mL. 88

Tabela 11- Quantidade de Tebuconazol encontrada no estudo de permeação através do septo nasal nas concentrações de 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL 90

Tabela 12 - Quantidade de Tebuconazol encontrada no estudo de permeação nas concentrações de 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL. 92
Tabela 13- Quantidade de Piraclostrobina encontrada no estudo de permeação nas concentrações de 0,3 mg/mL e 0,5 mg/mL. 92
Tabela 14- Resultados obtidos com a realização do teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina. 99
Tabela 15- Vestimentas utilizadas pelos trabalhadores rurais avaliados neste estudo *in vivo*. 102
Tabela 16- Quantidade de Tebuconazol (ng/cm2) encontrada no algodão avaliado em diferentes regiões do corpo em cinco trabalhadores e um pesquisador, após 4 horas de trabalho rotineiro. 104
Tabela 17- Quantidade de Tebuconazol (ng/cm2) encontrada em fita com estrato córneo avaliada em diferentes regiões do corpo em todos os participantes e o pesquisador, após 4 horas de trabalho. 105
Tabela 18- Valor de exposição dérmica de Tebuconazol (mg/região do corpo). 106
Tabela 19- Fator de penetração do Tebuconazol (FP%) no estrato córneo analisado para todos os participantes. 106
Tabela 20- Exposição e percentual de dose tóxica por hora de trabalhadores ao Tebuconazol durante a realização de pulverização de cebola. 106
Tabela 21- Quantidade de Piraclostrobina (ng/cm2) encontrada no algodão avaliado em diferentes regiões do corpo em cinco trabalhadores e um pesquisador, após 4 horas de trabalho rotineiro. 107
Tabela 22- Quantidade de Piraclostrobina (ng/cm2) encontrada em fita de estrato córneo avaliada em diferentes regiões do corpo em todos os participantes e o pesquisador, após 4 horas de trabalho. 107
Tabela 23- Valor de exposição dérmica de Piraclostrobina (mg/região do corpo). 108

Tabela 24- Fator de penetração do Piraclostrobina (FP%) no estrato córneo analisado para todos os participantes. 108
Tabela 25- Exposição e percentual de dose tóxica por hora de trabalhadores a Piraclostrobina durante a realização de pulverização de cebola. 108
Tabela 26- Resultados análise da Piraclostrobina e Tebuconazol na lágrima dos trabalhadores (ng/ mL). 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Teste de Opacidade e Permeabilidade em Córnea Bovina
DAS	Secretaria de Defesa Agropecuária
EC	Estrato Córneo
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FAO	*Food and Agriculture Organization*
GHS	(*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*
HC-UFPE	Hospital das Clínicas- Universidade Federal de Pernambuco
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IVPT	*In vitro permeation test*
Log Kow	Coeficiente de partição n-octanol-água
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MRM	Método de Reações Múltiplas
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PEE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
PIRA	Piraclostrobina
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
R^2	Coeficiente de determinação da regressão
TBZ	Tebuconazol
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEB-COOH	Carboxi-Tebuconazol
TEB-OH	Hidroxi-Tebuconazol
US EPA	Agência de Proteção Ambiental dos EUA
Y	Equação da reta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µg/cm²	Micrograma por centímetro quadrado
µg/mL	Micrograma por mililitro
µm	Micrometro
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
g/L	Grama por litro
km^2	Quilometro quadrado
>	Maior que
<	
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Micrometro
mm^2	Milímetro quadrado
±	Mais ou menos
ng	Nanograma
ng/cm^2	Nanograma por centímetro quadrado
$ng/cm^2/h$	Nanograma por centímetro quadrado por hora
Nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

2 OBJETIVOS 23

2.1 OBJETIVO GERAL 23

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

3 REFERENCIAL TEÓRICO 24

3.1 AGROTÓXICOS 24

3.2 FUNGICIDAS 26

3.2.1 Triazóis 26

3.2.2 Estrobilurinas 27

3.3 TEBUCONAZOL 28

3.4 PIRACLOSTROBINA 31

3.5 AGRICULTURA FAMILIAR 33

3.6 REGIÃO DO VALE DO SÃO FRANCISCO 34

3.6.1 Belém do São Francisco 35

3.6.2 Incidência de câncer em mulheres em Pernambuco 36

3.7 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL DE TRABALHADORES RURAIS A AGROTÓXICOS 36

3.8 LEGISLAÇÃO 38

3.9 ESTUDOS DE ABSORÇÃO DÉRMICA *IN VITRO* 41

3.10 MEMBRANAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS EM ESTUDOS DE ABSORÇÃO *IN VITRO*.....45

3.10.1 Pele humana 45

3.10.2 Mucosa vaginal.....45

3.10.3 Córnea bovina 46

3.10.4 Mucosa de septo nasal 47

3.11 BIODISTRIBUIÇÃO DE SUSTÂNCIAS QUÍMICAS NOS OLHOS 47

3.12 TESTE DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE EM CÓRNEA BOVINA 49

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....51

4.1 INSUMOS 51

4.2 SELEÇÃO DOS AGROTÓXICOS.....51

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS 51

4.3.1 Adaptação de método bioanalítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) para quantificação das amostras de Tebuconazol e Piraclostrobina 51

4.3.2 Soluções estoque.....52

4.3.3 Curva de calibração.....52

4.3.4 Preparo das amostras utilizadas para obtenção das condições espectrométricas e para otimização cromatográfica.....52

4.3.5 Processamento e Análise dos dados.....53

4.4 ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR PARA AS DIFERENTES MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....53

4.5 OBTENÇÃO, TRANSPORTE, TRATAMENTO, E ARMAZENAMENTO DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO*.....54

4.5.1 Pele humana 54

4.5.2 Mucosa vaginal e de septo nasal suínos 55

4.5.3 Córneas bovinas e suínas.....55

4.6 PREPARO DOS SISTEMAS DISPERSOS DOS AGROTÓXICOS TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA 56

4.7 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO O SISTEMA DE CÉLULAS DIFUSÃO VERTICAL 56

4.7.1 Procedimento de extração e preparo das amostras obtidas após realização do estudo de permeação cutânea *in vitro* 59

4.8 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO O SISTEMA DE CÉLULAS DIFUSÃO HORIZONTAL (*SIDE-BY-SIDE*) 60

4.8.1 Procedimento de extração e preparo das amostras obtidas após realização do estudo de permeação transmucosa e corneana *in vitro* 61

4.9 AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO OLHOS BOVINOS e SUÍNOS INTEIROS.....61

4.9.1 Procedimento de extração e preparo das amostras obtidas após realização do estudo de avaliação da biodistribuição *in vitro* utilizando olhos bovinos inteiros 63

4.10 TESTE DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE EM CÓRNEA BOVINA (BCOP) 63

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ESTUDOS *IN VITRO*.....65

4.12 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE RESÍDUOS DE TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA EM AGRICULTORES 65

4.12.1 Procedimento de extração e preparo das amostras dos estudos *in vivo* 68

4.12.2 Cálculos 68

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 70

5.1 ADAPTAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS TRIPLO QUADRUPOLO (LC-MS/MS) PARA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA 70

5.1.1 Condições espectrométricas e cromatográficas 70

5.2 ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR PARA AS DIFERENTES MEMBRANAS BIOLÓGICAS 79

5.3 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO O SISTEMA DE CÉLULAS DIFUSÃO VERTICAL 81

5.4 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO O SISTEMA DE CÉLULAS DIFUSÃO HORIZONTAL (SIDE-BY-SIDE) 87

5.4.1 Estudo de permeação *in vitro* utilizando mucosa vaginal suína 87

5.4.2 Estudo de permeação *in vitro* utilizando mucosa de septo nasal suína 90

5.4.3 Estudo de permeação *in vitro* utilizando córnea bovina 91

5.5 AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO OLHOS INTEIROS 94

5.5.1 Avaliação da biodistribuição *in vitro* utilizando olhos bovinos inteiros 95

5.5.2 Avaliação da biodistribuição *in vitro* utilizando olhos suínos inteiros 97

5.6 TESTE DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE EM CÓRNEA BOVINA (BCOP) 99

5.7 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE RESÍDUOS DE TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA EM AGRICULTORES 100

6 CONCLUSÃO 112

REFERÊNCIAS 114

1 INTRODUÇÃO

A agricultura em geral, e a agricultura familiar em particular, estão entre as atividades mais essenciais do mundo (PETRINI *et al*., 2016). As pequenas propriedades e a agricultura familiar são responsáveis pela maior parte da produção de alimentos em todo o mundo, combatendo a fome e fornecendo alimentos de alta qualidade e serviços ecossistêmicos (GRAEUB *et al*., 2016; LAPIERRE *et al*., 2019; MEDINA *et al.*, 2015).

O agricultor familiar, de acordo com a lei 11.326/2006 é aquele que se enquadra em todos os seguintes critérios: não ultrapassa a área máxima de propriedade fundiária do seu município ou município onde está localizada a fazenda; utiliza predominantemente mão de obra da própria família nas atividades econômicas de seu estabelecimento; possui renda familiar predominantemente proveniente de atividades econômicas vinculadas ao próprio estabelecimento; gere o seu estabelecimento com a sua família (PETRINI *et al*., 2016).

A agricultura em quase todo o mundo não pode existir sem o uso integrado com agrotóxicos (ILYUSHINA *et al*., 2020). Esses produtos desempenham um papel importante no crescimento das culturas agrícolas, podendo ser substâncias químicas de origem natural ou produzidas sinteticamente (DOST *et al.*, 2023).

Nas últimas décadas, o uso de agrotóxicos aumentou exponencialmente em todo o mundo devido à rápida industrialização e à agricultura moderna (CROCOLI, ORTIZ e MOURA, 2020; MACIRELLA, TRIPEPI e BRUNELLI, 2019). Toneladas de agrotóxicos são aplicadas anualmente em campos cultivados (JURAŁEKOVÁ *et al.*, 2022). Eles são usados para controlar organismos doentes, ervas daninhas, insetos, fungos, parasitas e pragas de roedores, além de aumentar a produção agrícola e a qualidade das culturas (COOPER E DOBSON, 2007).

Dentre as classes de agrotóxicos, destacam-se os fungicidas, sendo eles empregados para proteger e tratar várias plantas contra um amplo espectro de patógenos fúngicos (ATMACA *et al.*, 2019; MOHSIN *et al.*, 2019; YOUNESS *et al.*, 2018). Os fungicidas comumente usados são os triazóis, entre os quais a molécula de tebuconazol merece maior atenção (SHERSHNEVA *et al.*, 2019). Outra classe de fungicidas é a classes das estrobilurinas que se tornaram uma classe importante e comumente usada de fungicidas agrícolas, podendo destacar a Piraclostrobina como substância desta classe (KOVAčEVIć *et al.*, 2021).

De acordo com a literatura, no caso de formulações de agrotóxicos convencionais, apenas aproximadamente 0,1% da substância ativa é capaz de atingir o local alvo após a pulverização na superfície da cultura. Muitos agrotóxicos são perdidos no meio ambiente por evaporação, deriva de pulverização, escoamento superficial, decomposição, etc. (KUMAR *et al.*, 2019). Os

agrotóxicos contaminam o solo e os ambientes aquáticos e, consequentemente, causam danos significativos a macro e microorganismos não-alvo (MAHMOOD *et al.*, 2016).

Além do impacto ambiental, diversos estudos visam avaliar os danos à saúde dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos (CATTELAN *et al.*, 2018). Esses produtos podem entrar no corpo durante o horário de trabalho por inalação, absorção dérmica ou oral (ZHANG *et al.*, 2012). A contaminação por agrotóxicos via exposição ocupacional foi apontada como um dos principais problemas ambientais na agricultura globalmente (ZHANG *et al*., 2021).

De fato, as pessoas que realizam atividades agrícolas perigosas como por exemplo, carga, mistura ou aplicação de agrotóxicos têm maiores chances de sofrer riscos de toxicidade crônica devido à sua exposição contínua a diversos compostos nocivos (FILIPPI *et al.*, 2021). Além disso, a falta de uso de equipamentos de proteção individual pode aumentar a probabilidade e a extensão dos efeitos adversos nos indivíduos expostos.

Como as exposições prolongadas a baixas doses de agrotóxicos são frequentemente difíceis de avaliar, os sinais e sintomas associados podem não se manifestar clinicamente (HERNÁNDEZ *et al*., 2005). Contudo, é sabido que a exposição aguda e crônica a essas moléculas está associada a uma variedade de efeitos adversos à saúde, sendo esses efeitos principalmente neoplásicos, neurológicos, respiratórios, endócrinos e metabólicos (GANGEMI *et al*., 2016).

Considerando então que os agrotóxicos residuais no meio ambiente são contaminantes emergentes que representam uma ameaça à segurança ambiental e à saúde humana (VERGER e BOOBIS, 2013), há uma necessidade contínua no desenvolvimento de melhores técnicas de triagem para qualificar os riscos potenciais à saúde (TUTTLE *et al*., 2019).

Diante disto, este trabalho teve por objetivo realizar avaliação da permeação cutânea e transmucosa de dois agrotóxicos, o Tebuconazol e a Piraclostrobina, utilizando estratégias *in vitro*, e realizar uma avaliação *in vivo* de trabalhadores rurais, visando avaliar a exposição dérmica dos resíduos dos agrotóxicos, considerando as condições ambientais de trabalho na agricultura familiar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a exposição dérmica de trabalhadores rurais a resíduos dos agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina através de estudos de permeação cutânea e transmucosa *in vitro*, e por meio de estudo *in vivo* com trabalhadores rurais do município de Belém do São Francisco-PE, mediante a quantificação através de ferramentas bioanalíticas de alta precisão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) para detecção de resíduos de Tebuconazol e Piraclostrobina;
- Avaliar a permeação *ex vivo* do Tebuconazol e Piraclostrobina através de mucosas vaginal e septo nasal suínos e córnea bovina, utilizando células de difusão horizontal;
- Avaliar a permeação *ex vivo* do Tebuconazol e Piraclostrobina, através de pele humana, utilizando células de difusão vertical;
- Avaliar a biodistribuição oftálmica do Tebuconazol e Piraclostrobina, utilizando olhos bovinos e suínos inteiros;
- Avaliar o potencial de irritabilidade oftálmica do Tebuconazol e Piraclostrobina por meio do método alternativo do teste da opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP);
- Realizar estudo *in vivo* para avaliação da exposição dérmica de trabalhadores rurais aos resíduos de Tebuconazol e Piraclostrobina na lavoura de cebola.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 AGROTÓXICOS

A população mundial cresce em ritmo acelerado e com esse crescimento tem se projetado uma quantidade de 9 bilhões de pessoas no mundo até o ano de 2050, estando a maior parte do crescimento diretamente ligada aos países emergentes (GRILLO *et al*., 2021). Diante deste rápido crescimento populacional há um consequente aumento da necessidade de alimentos, o que vem gerando uma grande sobrecarga ao setor da agricultura (PANDA e ZHOU, 2023).

Com o aumento da população global necessita-se de forma urgente aumentar a produção agrícola em mais de 70% para acompanhar o aumento da demanda por alimentos que cresce a cada década (GRILLO *et al*., 2021). Visando aumentar a produção agrícola, o desenvolvimento e o uso de produtos agrotóxicos têm aumentado rapidamente em todo mundo (ZANG e GOSS, 2022).

Os agrotóxicos, também chamados de agroquímicos ou pesticidas, são produtos empregados na produção agrícola com o objetivo de melhorar a qualidade do solo e a produção (SHAHID e KHAN, 2022). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA): “qualquer substância ou mistura de substâncias destinada a prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga” se enquadra na categoria de agrotóxicos (EPA US, 2012).

São categorizados em (herbicidas, fungicidas e inseticidas), raticidas, moluscicidas, nematicidas, fertilizantes sintéticos, hormônios, agentes de calagem, de acidificação e condicionadores de solo. Esses compostos químicos são de grande importância para a produção agrícola atual. No entanto, tais produtos foram definidos de forma diferente por diferentes países em diferentes momentos (FENG *et al*., 2021; SHAHID e KHAN, 2022).

Esses produtos são utilizados na agricultura principalmente para controlar pragas e doenças, regular o crescimento das plantas e eliminar ervas daninhas para aumentar melhorar o rendimento das culturas (HOU *et al*., 2022; ROCCO *et al*., 2022). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), as pragas e doenças representam uma perda de aproximadamente 30% a 40% da produção agrícola total todos os anos (XIE *et al*., 2022).

A utilização de agrotóxicos é atualmente a estratégia de controle mais eficiente para proteger e melhorar o processo de produção de alimentos (XIE *et al*., 2022). Aproximadamente

4,6 milhões de toneladas de pesticidas são usados anualmente para controlar pragas e doenças (WU *et al*., 2018; ZHAO *et al*., 2018).

Nos últimos anos, uma variedade de formulações, contendo diversos ingredientes ativos, foram desenvolvidas e estão disponíveis no mercado (ILYUSHINA *et al*., 2020). Dentro da classificação dessas formulações tem-se as sólidas e as líquidas. Nas formulações sólidas tem-se: pó molhável, pó solúvel, granulados e grânulos dispersíveis em água. Já como formulações liquidas tem-se principalmente: soluções, emulsão aquosa, concentrado emulsionável e concentrado em suspensão (ADESUYI *et al*., 2019; FENG *et al*., 2021; RIZVI *et al*., 2019).

De uma maneira geral, os agrotóxicos são comumente aplicados nos campos agrícolas em forma de misturas em tanques. Essas misturas compreendem o uso de diferentes produtos de mesma classe química ou de diferentes classes (ILYUSHINA *et al*., 2020).

As formulações convencionais de agrotóxicos apresentam uma baixa eficiência de uso. Devido a isso, os produtos convencionais acabam por requerer múltiplas aplicações e com quantidades maiores de produtos químicos para controlar pragas e melhorar a eficiência produtiva (ZANG e GOSS, 2022).

Contudo, estima-se que apenas 0,1% dos ingredientes ativos consigam atingir de forma eficiente os alvos biológicos nocivos, por possuírem rápido escoamento, taxa de aplicação desigual ou baixas taxas de absorção/adsorção. Enquanto isso cerca de 90-99,9% do produto aplicado é perdido para o meio ambiente devido à deriva de gotículas, biodegradação, escoamento superficial, fotólise e evaporação (KUMAR *et al*., 2019; ZANG e GOSS, 2022).

Essa perda resulta em vários efeitos adversos ao meio ambiente. Esses produtos, devido às suas estruturas químicas estáveis, são refratários à degradação em condições naturais (ZHAO *et al*., 2018), logo eles se acumulam no solo, nas águas superficiais e subterrâneas, provocando um aumento da resistência do organismo alvo, além de poderem causar danos irreversíveis a ecossistemas e organismos não-alvo, incluindo os seres humanos (JURAŁEKOVÁ *et al*., 2022; KAH *et al*., 2018; MA *et al*., 2019).

No que diz respeito aos seres humanos, os agrotóxicos adentram no corpo por meio da ingestão de alimentos contaminados, inalação de poeira ou aerossóis e/ou por meio do contato direto com a pele e mucosas corporais durante o processo de manuseio desse tipo de produto (SANOJA-LÓPEZ *et al*., 2018).

Diversos problemas de saúde a curto ou longo prazo estão associados a exposição a agrotóxicos, incluindo tontura, náusea, diarreia, irritação na pele, irritação ocular, doenças oncológicas, hematológicas e pulmonares, cardiovasculares, desregulação endócrina,

deficiências do sistema imunológico, deformidades congênitas, etc. (ELAHI *et al*., 2019; ZHANG *et al*., 2018).

Os agrotóxicos se subdividem em classes como: fungicidas, herbicidas, inseticidas, raticidas, acaricidas e desfolhantes.

3.2 FUNGICIDAS

Os fungicidas são uma das classes de agrotóxicos registradas para uso em aplicações agrícolas com o objetivo de controlar o crescimento fúngico nas lavouras, inibindo o crescimento ou matando especificamente o fungo causador da doença (DOST *et al.*, 2023; ZUBROD *et al.*, 2019).

Dentro de sua classe, os fungicidas são divididos em subclasses de acordo com o seu mecanismo de ação. Atualmente, os fungicidas utilizados na agricultura estão limitados a poucas classes (TAKEMOTO *et al.*, 2018). Os mais prevalentes são os inibidores da respiração mitocondrial (estrobilurinas), inibidores da desmetilação de esteróis (triazóis) e inibidores da succinato desidrogenase (amidas) (LUAN *et al.*, 2022).

Uma das estratégias abordadas pelos produtores agrícolas para melhorar a eficiência dos fungicidas é a aplicação de misturas de fungicidas, onde os mesmos são combinados entre diferentes classes com diferentes modos de ação (LUAN *et al.*, 2022). A aplicação destas misturas é uma das abordagens mais importantes e mais utilizadas para prolongar a vida útil de fungicidas, visto que as misturas podem ampliar o espectro de ação, melhorar a eficácia de controle e retardar o desenvolvimento de resistência (SHARMA *et al.*, 2022).

Os grupos de fungicidas estrobilurinas e triazóis são importantes classes dentro do arsenal de produtos químicos de controle de pragas fúngicas que prejudicam as lavouras, sendo constantemente utilizados pelos trabalhadores rurais em misturas contendo a combinação destas duas classes, sendo essas misturas produzidas com o objetivo de ampliar o potencial antifúngico nas aplicações e consequentemente melhorar a eficiência curativa e protetora destes agentes fungicidas (SHARMA *et al.*, 2022).

3.2.1 Triazóis

Os triazóis são fungicidas sistêmicos de amplo espectro de ação e são amplamente usados na medicina, na indústria e na agricultura desde a década de 1970 (BEN OTHMÈNE *et al.*,

2020). Eles possuem ampla atividade antifúngica, controlando doenças que reduzem a produção de alimentos e ameaçam a saúde humana (CAO *et al.,* 2020).

Os fungicidas pertencentes a essa classe podem ser utilizados tanto para tratamentos curativos quanto para tratamentos protetores de culturas. Se forem utilizados como solução curativa, quando já há infecção fúngica instaurada, eles devem ser aplicados precocemente antes da formação de esporos resistentes para que apresentem eficiência de tratamento (PEREZ-RODRIGUEZ *et al.,* 2019).

Apesar de estarem no mercado desde a década de 1970, os fungicidas triazólicos ganharam popularidade no início dos anos 2000 como potentes agentes contra patógenos fúngicos, sendo hoje uma das classes de agrotóxicos mais amplamente utilizados no mercado global. Sua popularidade se deve as suas qualidades de proteção tanto de folhas quanto de frutos, podendo ainda ser aplicados em sementes, diminuindo a incidência de infecções fúngicas e aumentando a produtividade e a qualidade das lavouras (SHAHINASI *et al.,* 2017).

Atualmente, os triazóis correspondem a 30% dos fungicidas comercializados mundialmente (SHISHATSKAYA *et al.,* 2018). Com relação a seu mecanismo de ação, os antifúngicos triazólicos atuam inibindo a atividade da lanosterol-14-α-desmetilase, enzima participante da biossíntese do ergosterol, um importante constituinte das membranas de células fúngicas. A inibição da atividade desta enzima evita a desmetilação do lanosterol em ergosterol, levando a morte dos patógenos (PIMENTÃO *et al.,* 2020).

No entanto, o uso generalizado de agrotóxicos está se tornando uma preocupação global, pois a superexposição a esses agentes antifúngicos levou à redução da sensibilidade dos patógenos, ocasionando resistência a esses agentes (PRICE *et al.,* 2015). Além disso, os fungicidas triazólicos possuem potencial de serem tóxicos tanto para organismos-alvo quanto para organismos não-alvo, possuindo efeitos toxicológicos consideráveis aos organismos expostos (CAO *et al.,* 2018; KU *et al.,* 2015; MERCADANTE *et al.,* 2019). Evidencias recentes apontam que a exposição de organismos a esses agentes ocasiona em função anormal dos cardiomiócitos e desencadeia apoptose e estresse oxidativo (BEN OTHMÈNE *et al.,* 2020).

3.2.2 Estrobilurinas

Os fungicidas pertencentes a classe das estrobilurinas são um novo tipo de fungicida, sendo já reconhecidos como uma das classes mais importantes e comumente utilizadas na atualidade (MAO *et al.,* 2020). As estrobilurinas produzidas sinteticamente para serem

largamente comercializadas utilizam o antifúngico natural estrobilurina A como seu componente ativo principal (ZHANG *et al.*, 2017).

Os agentes antifúngicos desta classe são frequentemente utilizados com função protetiva, curativa ou ainda como agente translaminar contra todas as principais classes de fungos patogênicos em culturas, como cereais, frutas e vegetais (KUMAR *et al.*, 2020).

As estrobilurinas têm sido usadas para inibir a respiração mitocondrial fúngica (HOU *et al.*, 2022), elas se ligam ao complexo respiratório mitocondrial III e bloqueiam a transferência de elétrons do quinol para o citocromo *c* 1, atuando na respiração mitocondrial, bloqueando a produção de ATP e causando estresse oxidativo (BOLANOS-CARRIEL *et al.*, 2020; KOVAčEVIć *et al.*, 2021). Esses fungicidas têm sido considerados como sendo efetivos no controle de doenças fúngicas causadas por Ascomicetes, Basidiomicetos, Deuteromicetos e Oomicetos (LI *et al.*, 2021).

Levando em consideração os principais métodos de aplicação por pulverização e cobertura de sementes utilizados pelos produtores rurais vê-se que os fungicidas são levados muitas vezes a entrarem diretamente ou indiretamente em contato com o ambiente aquáticos e lixiviar na água (GAO *et al.*, 2009).

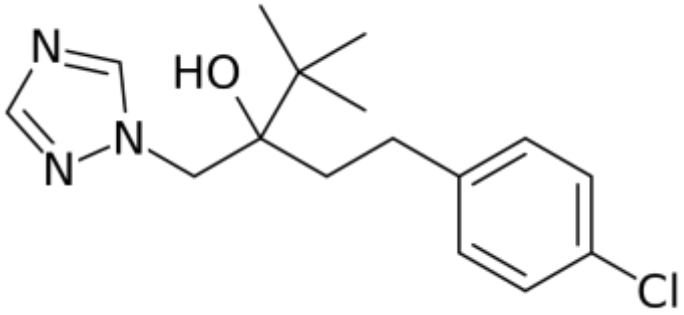
Estudos presentes na literatura relatam que as estrobilurinas são consideradas relativamente seguras para humanos, contudo, alguns estudos recentes demonstram que esses produtos agrotóxicos possuem alta toxicidade para organismos aquáticos (WANG *et al.*, 2021).

Além disso os fungicidas da classe das estrobilurinas têm sido associados a vários efeitos nas abelhas produtoras de mel, assim como: alterações comportamentais, redução na longevidade dos animais adultos e alterações no sistema imunológico desses animais, o que facilita sua infecção por diferentes agentes patogênicos (MALHAT *et al.*, 2019).

3.3 TEBUCONAZOL

O Tebuconazol ($C_{16}H_{22}ClN_3O$), (figura 1) é um agrotóxico pertencente a classe dos fungicidas sistêmicos, mais especificamente do grupo dos triazóis (BAćMAGA; WYSZKOWSKA e KUCHARSKI, 2021). A molécula deste agrotóxico compreende dois enantiômeros , refletindo a presença de um único centro quiral na estrutura desta molécula. Estudos indicaram que a atividade do (-)- *R* -Tebuconazol é maior do que a do (+)- *S* - Tebuconazol (LI *et al.*, 2012).

Figura 1- Estrutura química do Tebuconazol.



Fonte: DUBEY *et al*., 2020.

O Tebuconazol é o fungicida triazol mais utilizado no mundo (BELLOT *et al*., 2022), sendo substância ativa de muitas preparações, como, por exemplo, Falcon 250, Folicur 250. A principal forma de Tebuconazol é o concentrado emulsificável , que possui prazo de validade curto e baixa eficiência de utilização (SHI *et al*., 2022). Ele tem sido amplamente utilizado devido as suas características de alta eficácia contra a inibição de fungos alvo, amplo espectro de ação, baixa toxicidade, longa duração, forte absorção e ao seu baixo custo (BERGER *et al*., 2017; ZHAO *et al*., 2022).

Sendo o Tebuconazol indicado para controlar patógenos de plantas em mais de 60 culturas em todo o mundo (SUN *et al*., 2020). Como por exemplo, em lavouras de frutas, vegetais, nozes e cereais (JURAŁEKOVÁ *et al*., 2022). Este produto químico tem seu uso indicado para cobertura de sementes e pulverização foliar, com efetividade contra uma ampla gama de doenças, como ferrugem, bolor, oídio e manchas foliares causadas principalmente pelos patógenos *Curvularia* spp, *Botrytis cinerea* e *Fusarium* spp (AHEMAD e KHAN, 2012; SUGANTHI *et al*., 2021).

Sua atuação se dá por meio da inibição da biossíntese do ergosterol, componente chave das membranas celulares fúngicas**,** por meio da inibição da enzima esterol 14α-desmetilase (MONK *et al*., 2020; TODA *et al*., 2021; ZIOGAS e MALANDRAKIS, 2015).

O uso generalizado do Tebuconazol está associado à sua estabilidade físico-química, apresentando baixa solubilidade e ausência de fotólise em água (SANTOS-MIRANDA *et al*., 2016; US EPA, 2000). Ele foi considerado um pesticida de baixa toxicidade com base na Organização Nacional de Padrões de Toxicidade de Pesticidas da China (JÓNSDÓTTIR *et al*., 2016). No entanto seu uso frequente causa persistência ambiental de seus resíduos em solos e água por períodos de até vários meses (CAO *et al*., 2020).

Estudos comprovam que o Tebuconazol apresenta lipoficidade média a alta (Log Kow = 3,7) e é facilmente absorvido pelas partículas do solo (ČADKOVÁ *et al*., 2012). Sua solubilidade em água a pH 5,0- 9,0 e 20 ºC é de 36g/L. Além disso, ele apresenta meia-vida estimada variando de acordo com o tipo de solo e os enantiômeros da molécula, variando de dezenas de dias a 600 dias em média (CUI *et al*., 2018). Podendo ser detectado na maioria dos compartimentos ambientais, como ar, solo e água, além de frutas e vegetais (BELLOT *et al*., 2022).

O Tebuconazol tem efeitos tóxicos em organismos não-alvo (CHMIST *et al*., 2019), podendo induzir alterações fisiológicas, genéticas e neurotóxicas em animais do ambiente aquático e do solo. O Tebuconazol influencia também o ecossistema do solo, em particular os microorganismos que o colonizam. Além de exercer um efeito direto sobre a população de fungos ele pode afetar outras propriedades microbiológicas e bioquímicas do solo (BAćMAGA; WYSZKOWSKA e KUCHARSKI, 2021).

Apesar do Tebuconazol ter sido considerado seguro para utilização na produção agrícola sob condições regulatórias (JURAŁEKOVÁ *et al*., 2022), ele foi classificado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) como possível carcinógeno humano (US EPA, 2006), podendo a exposição humana ocorrer por sua presença em alimentos ou água potável, e também por inalação ou contato dérmico em áreas rurais onde este fungicida é amplamente aplicado (SCHUMMER *et al*., 2012; US EPA, 2021).

Além do exposto acima, a bula do produto Rival ®, concentrado emulsionável do Tebuconazol traz informações sobre alta toxicidade ocular. É relatado que em estudos realizados em coelhos, o produto mostrou-se extremamente irritante aos olhos, causando opacidade de córnea, hiperemia da conjuntiva e irite em todos os animais testados.

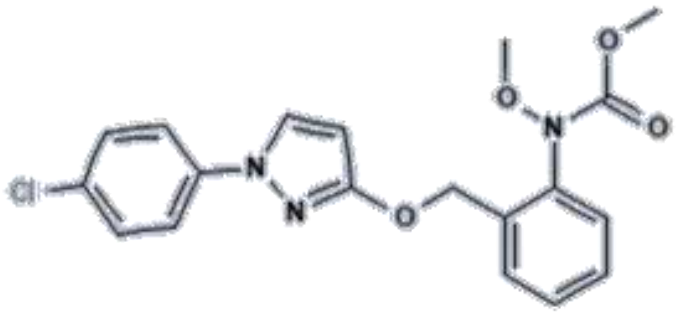
Diversos estudos encontrados na literatura indicam que o Tebuconazol apresenta riscos inevitáveis à saúde humana, incluindo toxicidade hepática (LI *et al*., 2020, ZHAO *et al*., 2017), toxicidade da tireoide (LI *et al*., 2020) desregulação endócrina (LI *et al*., 2019, MA *et al*., 2021), problemas de desenvolvimento e reprodução (LI *et al*., 2017) e cardiotoxicidade (BEN OTHMÈNE et al., 2020).

Vale ainda ressaltar que o Tebuconazol e seus metabólitos relatados: o Hidroxitebuconazol (TEB-OH) e Carboxitebuconazol (TEB-COOH), foram quantificados em amostras de urina de trabalhadores agrícolas, indicando maiores níveis de exposição nessa população específica (FUSTINONI *et al*., 2012; MERCADANTE *et al*., 2019 , OERLEMANS *et al.*, 2018).

3.4 PIRACLOSTROBINA

A Piraclostrobina ($C_{19}H_{18}ClN_3O_4$), (figura 2) é um agrotóxico fungicida sistêmico sintético pertencente à família das estrobilurinas (DOMINGUEZ *et al*., 2021). A molécula deste agrotóxico apresenta uma estrutura de pirazol que foi descoberta pela empresa BASF no ano de 1993 e entrou em comercialização em 2002 (LIN *et al*., 2022).

Figura 2- Estrutura química da Piraclostrobina.



Fonte: PubChem, 2022.

Atualmente, a Piraclostrobina faz parte do maior grupo de fungicidas utilizados em todo o mundo (LI *et al*., 2020). Ela se tornou mais popular nos últimos anos devido ao seu bom controle fúngico, alta eficiência, amplo espectro de ação e maiores perfis de segurança do que os fungicidas usados anteriormente (CHEN *et al*., 2018; MA *et al*., 2019), sendo amplamente utilizada na produção agrícola mundial (GAO *et al*., 2017; LI *et al*., 2020; ZHANG *et al*., 2021).

Desde seu início de comercialização, em 2002, a Piraclostrobina vem demonstrando forte presença no setor agrícola internacional, estando presente como princípio ativo de inúmeros produtos comerciais, como por exemplo: Priaxor™, Comet®, Abacus®, Headline®, Vivarus® (DOMINGUEZ *et al*., 2021). As formulações frequentemente utilizadas de Piraclostrobina são os concentrados emulsificáveis (CE), concentrado em suspensão (SC) e grânulos dispersíveis em água (LI *et al*., 2018; LIANG *et al*., 2021).

A Piraclostrobina tem sido amplamente utilizada para controlar quase todos os tipos de patógenos fúngicos em culturas de trigo, milho, arroz, frutas cítricas, videira, batata, feijão, maçã, trigo, alface, algodão, amendoim, café, girassol, entre outras frutas e hortaliças (ACHARYA *et al.*, 2018; DOMINGUEZ *et al*., 2021; SANTANA *et al*., 2020; ZHANG *et al*., 2019). Se apresentando efetiva contra oídio, ferrugem, mofo cinzento, míldio e brusone, causadas principalmente por Oomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e fungos assexuados,

como *Botrytis cinerea*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Macrophoma musae*, *Colletotrichum* spp. e *Sphaceloma ampelinum* (GAO *et al*., 2019; HE *et al*., 2017). Podendo ser aplicado em folhas, palha, sulcos e sementes. (MAPA, 2020).

O Mecanismo de ação deste agrotóxico se dá por meio da inibição da respiração mitocondrial pela ligação no sítio oxidante de ubiquinol, do complexo III bloqueando a cadeia de transferência de elétrons e promovendo decréscimo na síntese de ATP, o que leva a morte do patógeno (LI *et al*., 2020).

Embora os agrotóxicos a base de Piraclostrobina sejam considerados produtos químicos agrícolas ecológicos, devido à baixa persistência no ambiente natural (MERCADER *et al*., 2013) nos últimos anos, devido a extensa utilização, a Piraclostrobina vem sendo frequentemente detectada em ambientes de solo e água (GUO *et al*., 2017; WIGHTWICK *et al*., 2012), incluindo águas superficiais e subterrâneas (REILLY *et al*., 2012).

O uso extensivo e irracional desse fungicida leva a um excesso de contaminantes sendo escoado para o ambiente aquático por meio da irrigação agrícola e do escoamento superficial, portanto, os organismos aquáticos são contaminados com a presença desse composto na água. A piraclostrobina é altamente tóxica para organismos aquáticos não-alvo, especialmente peixes, anfíbios e outros animais aquáticos (LI *et al*., 2018; ZHANG *et al*., 2017), como *Danio rerio, Lepomis macrochirus, Daphnia magna, Xenopus tropicalis* e *Chlorella vulgaris* (HUANG *et al*., 2021).

Além de efeitos nocivos para organismos aquáticos, estudos relatam efeitos nocivos da Piraclostrobina em organismos que vivem no solo, podendo induzir estresse oxidativo e danos ao DNA (MA *et al*., 2019). As abelhas são exemplos de outros organismos que podem ser afetados por meio da exposição a esse fungicida, podendo afetar as mitocôndrias dos músculos de voo desses animais (BATISTA *et al*., 2020; TADEI *et al*., 2019).

Além do ambiente aquático, do solo, e em animais, resíduos de Piraclostrobina também foram detectados em alguns alimentos como em cafés verdes (OLIVEIRA *et al*., 2016), banana (FU *et al*., 2016), uva (WANG *et al*., 2018), frutas cítricas (LIU *et al*., 2019) e amendoim (ZHAO *et al*., 2021) o que representa um sério risco de exposição humana, a partir do consumo desses alimentos, sendo necessários que produtos agrícolas sejam submetidos a rigorosos controles de qualidade e segurança para evitar que o excesso de agrotóxicos cause danos, seja à saúde humana ou ao meio ambiente (DOMINGUEZ *et al*., 2021).

3.5 AGRICULTURA FAMILIAR

Estima-se que existam cerca de 16,5 milhões de fazendas familiares na América Latina, nas quais trabalham cerca de 60 milhões de pessoas, estando 56% dessas fazendas localizadas na América do Sul (CEPAL, 2014). Essas fazendas familiares representam mais de 90% das fazendas do mundo e são globalmente reconhecidas como essenciais para a segurança alimentar, visto que a maior parte dos alimentos do mundo são produzidas por elas (BERCHIN *et a*l.,2019).

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU) a agricultura familiar não pode mais ser ligada a produção de subsistência, pelo contrário, ela é responsável por 80% da produção alimentícia que é consumida mundialmente nos grandes centros urbanos (ONU, 2019). A agricultura familiar, complementar à agricultura de grande escala, é essencial para a segurança alimentar global, especialmente nos países em desenvolvimento, visto que ela proporciona a criação de mais empregos nas áreas rurais e aumenta a renda das famílias (BERCHIN *et a*l.,2019).

A definição de agricultura familiar varia de acordo com cada país, contudo em geral ela pode ser descrita como todas as atividades agrícolas de base familiar que estão ligadas a aspectos do desenvolvimento rural, ou seja, atividades que são geridas por uma família e dependem da mão de obra familiar (LAPIERRE *et a*l.,2019). Os produtores nesse tipo de segmento possuem uma posse de terra relativamente limitada, acesso limitado a recursos (financeiros, materiais, tecnológicos, capital humano, infraestrutura) e uma renda derivada principalmente da terra (CERVANTES-ZAPANA *et al*., 2020).

A importância dos pequenos produtores rurais começou a ser reconhecida na década de 1970, contudo as propriedades agrícolas familiares ganharam força a partir da década de 1990 (WANDERLEY, 2014). Sendo hoje a agricultura familiar vista como potencial de geração de renda nas comunidades rurais e locais e desempenhando um papel importante na preservação dos alimentos tradicionais e da agrobiodiversidade (ZAHAIKEVITCH *et a*l.,2022).

Acredita-se que a agricultura familiar é uma forma de agricultura mais sustentável quando em comparada com a agricultura corporativa de larga escala. As pequenas propriedades de cunho familiares são em geral consideradas mais diversificadas e utilizam práticas mais tradicionais, o que acaba preservando mais características da paisagem (WUEPPER *et a*l.,2020).

No Brasil, a Lei 11.326/2006 foi o principal marco legal da agricultura familiar, possibilitando a inclusão da atividade relacionada à agricultura familiar nas estatísticas oficiais

do governo, garantindo base legal para políticas públicas voltadas especificamente para esse setor, e reconhecendo os agricultores familiares como atores políticos e beneficiários diretos das políticas públicas (PETRINI *et a*l.,2016).

Embora a agricultura familiar seja responsável pela produção de uma parcela predominante dos alimentos produzidos no mundo, pouca informação sobre o uso de agrotóxicos por esses pequenos agricultores está disponível, especialmente no que diz respeito aos países de baixa e média renda (LAPIERRE *et a*l.,2019).

Já é sabido o potencial tóxico de produtos agrotóxicos para os seres humanos. Sabe-se que a exposição prolongada a esses agentes está ligada a diversos problemas de saúde, como imunossupressão, desequilíbrios hormonais, anormalidades reprodutivas, câncer e deterioração cognitiva (FAO, 2018). No entanto poucos estudos exploraram a utilização de agrotóxicos no contexto da agricultura familiar camponesa, apesar do potencial impacto dessa prática na saúde animal e humana, bem como na renda dos agricultores (TASHO e CHO, 2016).

3.6 REGIÃO DO VALE DO SÃO FRANCISCO

A Região do Vale do São Francisco compreende a zona do semiárido, composta por cerca de 900 municípios pertencentes ao Distrito Federal e aos estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás, Pernambuco, Sergipe e Alagoas, e é conhecida como Vale do São Francisco. A região apresenta características de pluviosidade baixa e irregular (concentrada num período de 3 a 5 meses), temperaturas altas e elevadas taxas de evapotranspiração. O solo da região é originado de rochas cristalinas, predominantemente rasos, pouco permeáveis e naturalmente férteis (EMBRAPA, 2020).

Esse conglomerado é formado por 07 municípios e abrange uma área de aproximadamente 9.589,8 km^2 e 134.212 mil habitantes, sendo 77.140 habitantes na área urbana e 57.072 habitantes na zona rural (IBGE, 2010). Desta forma, o Vale do São Francisco apresenta-se como uma extensa área com potencial irrigado e divide-se em quatro regiões fisiográficas: Alto, Médio, Submédio e Baixo São Francisco (CODEVASF, 2023).

Os estados da Bahia e Pernambuco são os responsáveis pelos maiores percentuais do valor da produção gerados pela fruticultura na área de atuação do Banco do Nordeste do Brasil, com 32% e 22% respectivamente, devido à grande produção de uva e manga, cultivos esses que se concentra na Bacia do São Francisco (VIDAL, 2021)

Essa região se destaca por apresentar como atividade econômica exclusivamente a agricultura e por ser onde se encontra o maior cultivo de cebola, manga, melão, melancia e

tomate da região. Os produtos são cultivados durante todo o ano, principalmente a cebola e a manga, com garantia de venda da produção para compradores de diversos municípios (IBGE, 2010).

3.6.1 Belém do São Francisco

O município de Belém do São Francisco encontra-se a aproximadamente 540 km de Recife, inserido na mesorregião do São Francisco Pernambucano, possuindo área total de 1.892,65 km² (figura 3). O município encontra-se inserido no semiárido nordestino entre as latitudes de 8° 16'S a 8° 50'S e longitudes de 38° 34'W a 39° 21'W (LOPES e DE MOURA, 2013). A população do município é de 20.253 habitantes, segundo o Censo de 2010.

Figura 3- Mapa do estado de Pernambuco, destacando a cidade de Belém do São Francisco.

Fonte: https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/pe/belem-do-sao-francisco.html.

Seu clima é tropical semi-árido, com chuvas de verão. O período chuvoso se inicia em novembro com término em abril. A temperatura média anual é de 26,0°C. Está inserido na Depressão Sertaneja, relevo predominantemente suave ondulado (PERNAMBUCO, 2017).

A base econômica do município é a agricultura, sobretudo a fruticultura irrigada, com exportações para a Europa, Japão e América do Norte. Além disso, a cidade de Belém do São Francisco tem um dos maiores potenciais turísticos do interior do Estado. É no território desse município, por exemplo, que fica a maior concentração de ilhas fluviais do Brasil: são 88 ilhas, umas pequenas, outras maiores, todas banhadas pelas águas do rio São Francisco, conhecido popularmente como "Velho Chico".

3.6.2 Incidência de câncer em mulheres em Pernambuco

De acordo com o último censo agrícola realizado no Brasil, o AgroCenso do ano de 2017, promovido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui cerca de 15 milhões de pessoas ocupadas com agricultura, sendo 780 mil dessas pessoas no estado de Pernambuco, distribuídos em 281 mil estabelecimentos agropecuários. Dos estabelecimentos agrícolas situados em Pernambuco 27 % são organizados por produtoras do sexo feminino e 25 % relataram fazer o uso de produtos agrotóxicos (IBGE, 2017).

No Censo brasileiro realizado em 2010 o estado de Pernambuco ocupa a terceira colocação com o maior percentual de mulheres na agricultura, estando atrás apenas da Bahia e Rio Grande do Sul, sendo 15,6 % de mulheres em atividades de agricultura. Mais especificamente no município de Belém do São Francisco, onde foi realizada a avaliação *in vivo* deste trabalho, o percentual de mulheres que trabalham na agricultura chega a 43,7% (IGBE, 2010).

O instituto Nacional de Câncer (INCA) divulga anualmente as estimativas de incidência de câncer no Brasil e em todas as unidades de nossa federação. Para o ano de 2023 estima-se um total de 9.786.666 casos de câncer registrados no país, sendo destes aproximadamente 25 mil no estado de Pernambuco.

Com relação aos cânceres que atingem a população feminina, é estimado para o ano de 2023 em Pernambuco 2.280 casos de câncer de mama, 770 casos de câncer de colo de útero, 450 casos de câncer de ovário e 260 casos de câncer de corpo de útero. Esses números representam 15,04% do total de casos de câncer estimados para o ano de 2023 no estado de Pernambuco.

3.7 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL DE TRABALHADORES RURAIS A AGROTÓXICOS

O setor agrícola brasileiro, vem em evidente crescimento durante as últimas décadas, o que consolidou o Brasil como o segundo maior exportador agrícola mundial e o país como o maior consumo mundial de agrotóxicos (FAO, 2018).

Os agrotóxicos são produtos químicos amplamente utilizados em lavouras para controlar pragas, prevenir doenças de plantas e consequentemente melhorar o rendimento das plantações (SAAD-HUSSEIN *et al.*, 2019). Além disso, diferentes formulações são comumente utilizadas simultaneamente em misturas, proporcionando a aplicação de um número significativo de compostos genotóxicos (DHANANJAYAN *et al*., 2019).

Os trabalhadores rurais são classificados como um dos principais grupos de risco de exposição a agrotóxicos, visto que estão em contato com esse tipo de produto em diferentes momentos, desde o seu transporte, mistura, carregamento e aplicação (DHANANJAYAN *et al*., 2018; KATSIKANTAMI *et al*., 2019). Estes trabalhadores rurais ligados a uma alta porcentagem de intoxicação ocupacional devido a exposição a agrotóxicos (SAAD-HUSSEIN *et al*., 2019) o que resulta em problemas de saúde, tanto a curto como a longo prazo (MARETE *et al*., 2021).

A exposição ocupacional a produtos agrotóxicos representa um grande risco para a saúde dos trabalhadores agrícolas, em particular os trabalhadores ligados a agricultura familiar (FLYNN *et al*., 2021). Na agricultura corporativa de grande escala, são utilizados aviões e tratores durante o processo de pulverização dos agrotóxicos, tornando a exposição ocupacional muito menor quando comparada com a agricultura familiar de pequena escala, onde os trabalhadores utilizam pulverizadores costais ou manuais (MARETE *et al*., 2021).

A exposição a agrotóxicos ocorre principalmente durante três diferentes momentos: mistura/carga, pulverização e reentrada (KASIOTIS *et al*., 2017). As etapas de mistura e carregamento são associadas a maiores percentuais de exposição, visto que nesses momentos os trabalhadores estão em contato com os produtos concentrados, contudo o processo de pulverização também merece atenção em virtude de ser uma atividade com tempo considerável de duração (RINCÓN *et al*., 2018).

Diversos estudos relatam que as práticas seguras recomendadas para o manuseio de agrotóxicos não são seguidas em países de média e baixa renda. Esse cenário em países de baixa renda se dá por diversas razões regulatórias, sociais, culturais e ocupacionais (BAGHERI *et al.*, 2018; GESESEW *et al.,* 2016; MEMON *et al.,* 2019; NDAYAMBAJE *et al.,* 2019; VAN DEN BERG *et al.,* 2020).

Pode-se destacar como principais impulsionadores do uso não consciente desses produtos as regulamentações fracas, falta de informação sobre os riscos de contaminação, uso de equipamentos de pulverização que apresentam riscos de vazamentos, falta de equipamentos de proteção individual (EPI) e baixo nível de informação acerca dos processos de aplicação adequada, armazenamento e técnicas que reduzam o potencial de exposição (SCHREINEMACHERS *et al*., 2012; FLYNN *et al*., 2021).

Frequentemente os agrotóxicos são pulverizados com pouco ou nenhum uso de EPI, além disso é comum que esses produtos fiquem armazenados nas residências dos trabalhadores, colocando os trabalhadores e suas famílias em maior risco de exposição (FLYNN *et al*., 2021).

A exposição ocupacional aos agrotóxicos pode ocorrer por diferentes vias, destacam-se principalmente a exposição por inalação ou contato com a pele durante o preparo das diluições do produto a serem pulverizadas ou durante a pulverização. Além destes meios citados, a exposição pode ocorrer por via oral com o contato mão-boca ou por meio do consumo de alimentos contaminados durante o horário de trabalho (MOSHOU *et al*., 2021). A exposição por via dérmica é relatada como sendo a principal forma de exposição dos trabalhadores rurais durante a aplicação de agrotóxicos (MANDIC-RAJCEVIC *et al*., 2019; RINCÓN *et al*., 2018).

Exposição dos olhos também precisa ser levada em consideração, já que os agrotóxicos têm um grande potencial de danos químicos a este tecido. A segurança dos olhos é necessária em todas as etapas, desde a mistura e diluições de agrotóxicos concentrados ou muito tóxicos, até a sua aplicação na lavoura. Sendo assim, são de extrema necessidade o uso de protetores faciais ou óculos de proteção que devem ser usados em qualquer pulverização de agrotóxico, seja para evitar o contato visual com a poeira e outras partículas, como proteger contra as gotículas lançadas durante a aspersão (KUMAR, 2019).

A Organização para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) conjuntamente instituíram diretrizes para o manuseio seguro de produtos agrotóxicos. As diretrizes recomendam o uso de equipamentos de segurança durante o processo de mistura e pulverização dos produtos, a utilização de macacões limpos de mangas compridas, chapéus, aventais resistentes a produtos químicos, protetores faciais, botas de borracha e respiradores. Além disso, as diretrizes falam sobre o método de descarte das embalagens vazias e dos resíduos indesejados, que seria levar de volta ao fabricante para destruição por meio de um método de incineração adequado (MEHMOOD *et al*., 2021).

3.8 LEGISLAÇÃO

No Brasil, após a revisão da constituição de 1988, a legislação ambiental brasileira apresentou considerável avanço com a publicação da Lei 7.802, conhecida como a “Lei dos Agrotóxicos”, em 11 de julho de 1989 e regulamentada pelo Decreto no nº 4.074 de 2002. A promulgação desta lei foi um marco do movimento “Nossa Natureza” onde o governo brasileiro da época considerou estratégico aprovar um pacote de medidas pró meio ambiente (LONDRES, 2011).

Anterior a esta Lei, existia apenas o Decreto nº 24.114, de 14 de abril de 1934 (época na qual os agrotóxicos não eram utilizados como biocidas), sendo este decreto considerado a base regulamentadora do setor (GARCIA, BUSSACOS e FISCHER, 2005).

A lei dos agrotóxicos trata de temáticas relativas à pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins (BRASIL, 1989).

Como pontos de destaque da "Lei dos Agrotóxicos" pode-se citar:

- Os agrotóxicos só poderão ser produzidos, exportados, importados, comercializados e utilizados, se previamente registrados em órgão federal;
- Os usuários de agrotóxicos deverão efetuar a devolução das embalagens vazias dos produtos aos estabelecimentos comerciais em que foram adquiridos, sendo as empresas produtoras e comercializadoras responsáveis pela destinação das embalagens;
- A venda de agrotóxicos deverá ser feita através de receituário próprio, prescrito por profissionais legalmente habilitados (engenheiro agrônomo, engenheiro florestal ou técnico agrícola);
- Para serem vendidos ou expostos à venda em todo o território nacional, os agrotóxicos são obrigados a exibir rótulos próprios e bulas contendo diversas informações, dentre elas a classificação toxicológica do produto com símbolos de perigo e frases de alerta;
- As embalagens dos agrotóxicos deverão ser projetadas e fabricadas de forma a impedir qualquer vazamento, evaporação, perda ou alteração de seu conteúdo e de modo a facilitar as operações de lavagem, classificação, reutilização e reciclagem, além de serem suficientemente resistentes em todas as suas partes, de forma a não sofrer enfraquecimento e a responder adequadamente às exigências de sua normal conservação e devem ser providas de um lacre que seja irremediavelmente destruído ao ser aberto pela primeira vez.

De acordo com o Decreto 4.074/02, para o registro de um novo produto no país, o fabricante deve submeter os estudos de comprovação de eficácia e de segurança do agrotóxico ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Secretaria de Defesa Agropecuária – DAS, ao Ministério da Saúde (MS), através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e ao Ministério do Meio Ambiente, através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Cabendo a esses órgãos analisarem os estudos apresentados, em suas devidas áreas de competência, e demostrar se o produto apresenta riscos ou não. Quando nenhum dos órgãos demostra por meio de evidencias a inadequação e/ou ineficácia do produto, ele é aprovado para registro. A questão é que nem sempre é possível estabelecer á relação entre a exposição aos

agrotóxicos e os danos por eles causados à saúde e ao meio ambiente (BRASIL, 2002; LONDRES, 2011; PERES, MOREIRA e DUBOIS, 2003).

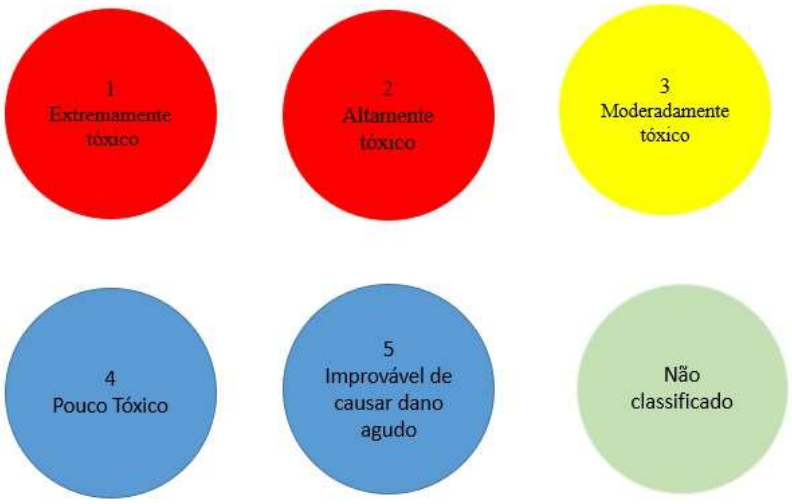
Segundo o Decreto 4.074/02, o documento fornecido para solicitação de registro deve conter informações a respeito do diagnóstico, doses de aplicação, quantidade total a ser adquirida, época de aplicação, intervalo de segurança e informações específicas sobre cultura e/ou problema. Isto torna evidente a necessidade de uma visita técnica, pelo profissional habilitado, à propriedade rural antes da emissão de um receituário agronômico (BRASIL, 2002; LONDRES, 2011).

Em 2017 foi iniciada uma reclassificação toxicológica dos produtos agrotóxicos comercializados no Brasil (ANVISA, 2021). Com isso, o Brasil passou a ter regras harmonizadas com as de países da União Europeia e da Ásia, entre outros, fortalecendo a comercialização de produtos nacionais no exterior (CROPLIFE, 2022).

O sistema com essa finalidade foi desenvolvido pela Organização das Nações Unidas (ONU) – o chamado GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*), que está sendo adotado por mais de 50 países e representa uma ferramenta importante no avanço à proteção da saúde, uma vez que configura um sistema de comunicação harmonizado e compreensível para usuários, fabricantes, trabalhadores e consumidores (CROPLIFE, 2022).

No brasil o sistema GHS passou a entrar em vigor por meio do Decreto no nº 10.833 de 7 de outubro de 2021. O novo modo de classificação se utiliza de números e cores para classificar as substâncias e está descrito na figura 4 abaixo:

Figura 4- Exemplificação do sistema GHS de classificação.



Fonte: Adaptado de Anvisa 2021.

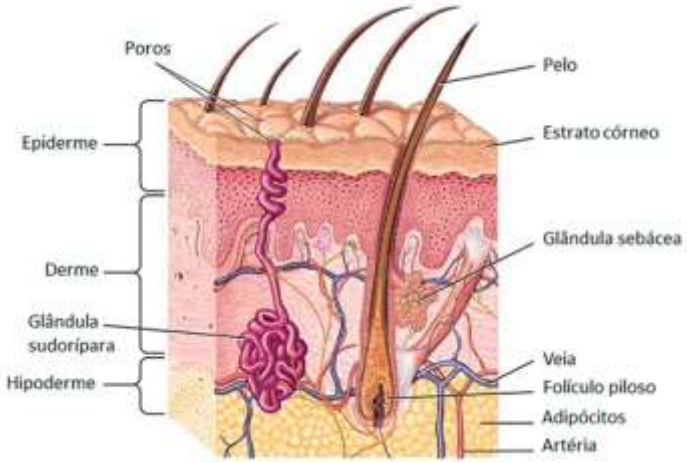
É importante salientar ainda, que os Estados e Municípios também podem aprovar leis próprias para regulamentar o comércio, o armazenamento, o transporte e o uso de agrotóxicos, bem como o descarte de embalagens vazias. A única exigência é que estas leis não sejam mais permissivas do que as leis federais e as estaduais no caso dos municípios (LONDRES, 2011).

A RDC 294 de 24 de julho de 2019 determina que "devem ser apresentados estudos para estimar a absorção cutânea, *in vitro* ou *in vivo* ou ambos, específicos para a formulação concentrada e na maior diluição (menor dose indicada). No caso de ausência desses estudos, poderão ser apresentados estudos conduzidos com outras formulações, concentrações e diluições, ou valores padrão de absorção".

3.9 ESTUDOS DE ABSORÇÃO DÉRMICA *IN VITRO*

De modo geral, a pele é constituída por três barreiras principais: a epiderme, subdividida em epiderme não viável (estrato córneo) e epiderme viável, a derme e a hipoderme (Figura 5). A epiderme, camada que fica em contato com o meio exterior, é fina e avascular, representando a barreira fisiológica de proteção. A derme é a camada abaixo da epiderme, caracterizada por ser altamente vascularizada, além de contribuir na elasticidade, coesão e termorregulação da pele. A hipoderme é a camada mais profunda da pele e assume funções de proteção e reserva energética (COUTURAUD, 2009; RHEIN *et al*., 2009).

Figura 5- Figura esquemática das camadas da pele e estruturas anexas.

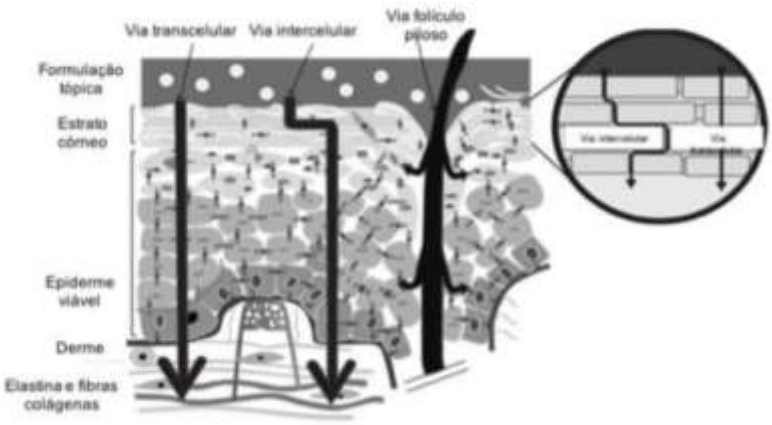


Fonte: https://afh.bio.br/sistemas/tegumentar/1.php.

Com base na estrutura da pele, existem três rotas possíveis para absorção percutânea: intercelular, intracelular e transapêndice (Figura 6). Na rota intercelular ocorre difusão através

da matriz lipídica atravessando os pequenos espaços entre as células. Na via intracelular, ocorre a passagem tanto pela bicamada lipídica quanto pelo citoplasma de queratinócitos mortos difundindo-se pelos corneócitos do *estrato córneo*. Já a via transapêndice envolve a penetração através das glândulas sudoríparas e dos folículos pilosos com suas glândulas sebáceas associadas (NAFISI e MAIBACH, 2018).

Figura 6- Vias de permeação através da pele.



Fonte: Adaptado de Bolzinger *et al*., 2012.

Os estudos de permeação da pele que tradicionalmente, desempenham um papel essencial na seleção de medicamentos para a aplicação tópica ou transdérmica, tem se tornado uma importante forma de avaliação para prever o risco de exposição a produtos químicos (FABIAN *et al*., 2017), podendo ser utilizados para obtenção de dados de exposição ocupacional a agrotóxicos, como mostra centenas de estudos publicados (AGGARWAL *et al*., 2014; AGGARWAL *et al*., 2015; EFSA, 2011; EFSA, 2017).

Para realizar estudos de absorção dérmica podem ser empregados vários métodos, podendo esses métodos serem baseados em modelos *in vivo*, que consideram o uso de animais (incluindo humanos), e *in vitro*, que são os que tentam mimetizar o comportamento de organismos vivos usando peles genuínas ou sintéticas, a partir de pele de diferentes animais, incluindo porco, camundongo, rato, cobaia e pele humana (ABD, 2016; SAWERES-ARGÜELLES *et al*., 2023).

Os métodos mais comuns para avaliar a absorção cutânea *in vitro* empregam células de difusão, que trazem como vantagens, o baixo custo, curto tempo de ensaio e boa reprodutibilidade dos resultados (BARTOSOVA e BAJGAR, 2012; BRAIN *et al*., 2002; SHEN *et al*. 2014). Conforme diversos relatos na literatura, a célula estática de Franz, descrita por

Thomas J. Franz em 1975, (Figura 7) consiste no aparato mais utilizado para realizar os estudos de absorção cutânea *in vitro* (ARAÚJO, 2016; LEAL *et al*.; 2017).

Figura 7- a) Célula de difusão de Franz. (b) Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz.

Fonte: https://permegear.com/diffusion-cells/.

Esses dispositivos são constituídos de material inerte, como vidro (transparente ou âmbar) ou Teflon. Apresentam dois compartimentos, um doador (para aplicação do produto teste) e outro receptor (a partir da qual a concentração do produto teste pode ser investigada). Os compartimentos citados são separados por uma membrana sintética ou natural, com uma superfície efetiva de 1,0–5,0cm^2 (ZSIKÓ, 2019).

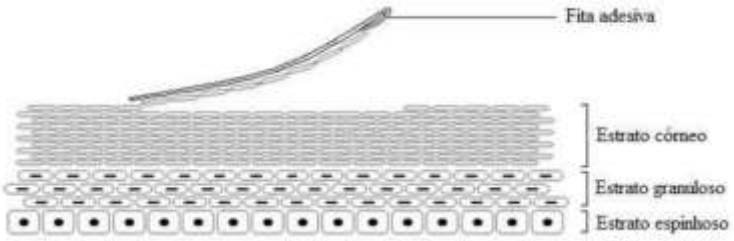
O compartimento receptor, com capacidade de 5 a 12mL é preenchido com uma solução que favorece as condições *sink*, isto é, uma condição de não saturação do sistema dinâmico, possibilitando um fluxo contínuo do fármaco, estando a solução receptora mantida constantemente sob agitação por meio de uma barra magnética e um espiral (SILVA *et al*., 2010). A temperatura é mantida por meio de um "banho jaquetado" com água termostatizada que circunda o compartimento receptor (KATTAN *et al*., 2000).

A quantidade de fármaco que permeia do compartimento doador para o receptor é determinada em função do tempo pela remoção do fluido receptor em intervalos pré-definidos (OECD, 2004; SILVA et al., 2010; SIMON et al., 2016). A utilização de sistemas automatizados facilita o trabalho dos pesquisadores e reduze o erro da amostragem humana (ZSIKÓ, 2019).

Ao final do ensaio de absorção cutânea, é possível também quantificar o fármaco remanescente no estrato córneo (EC), retirando essa camada de células pela técnica de tape-

stripping, (figura 8) que consiste na retirada sequencial de camadas do EC com o uso de fitas adesivas adequadas (NARKAR, 2010).

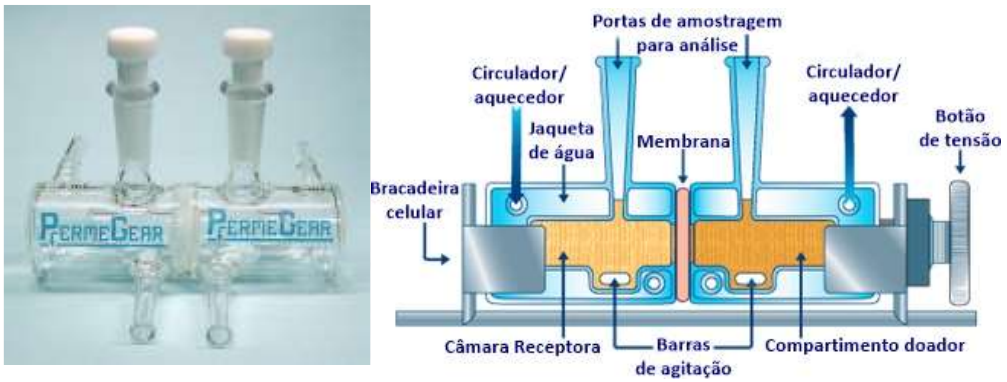
Figura 8- Representação esquemática da técnica de *tape-stripping*.



Fonte: KANFER, 2010.

As células de difusão horizontal, lateral-bi-lateral ou *side-by-side* (Figura 9), assim como as células de Franz são classificadas como células de difusão estáticas, onde o volume da solução receptora é mantido constante. Elas devem ser constituídas de material inerte, como vidro (transparente ou âmbar) ou Teflon (KATTAN *et al*., 2000). Podem ser usadas para pesquisas que usem barreiras e meios úmidos, como na absorção nasal, bucal, vaginal entre outros (TRBOJEVICH, 2016).

Figura 9- (a) Células de difusão *side-by-side*. (b) Representação esquemática de uma célula de difusão *side-by-side*.



Fonte: https://permegear.com/side-bi-side-cells/.

A célula é dividida em compartimentos receptor e doador, com um baixo volume de solução (3,5 mL) para cada compartimento e uma pequena área de membrana (0,64 cm^2), além de que apresentam barras de agitação magnética para ambos os lados. O sistema é controlado pela água termostatizada que circula ao redor dos dois compartimentos (KATTAN *et al*., 2000).

3.10 MEMBRANAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS EM ESTUDOS DE ABSORÇÃO *IN VITRO*

3.10.1 Pele humana

Nos estudos de permeação cutânea, a biomembrana mais aconselhada a ser utilizada consiste na pele humana *ex vivo* que geralmente é proveniente de cirurgia plástica. No entanto, as amostras de pele são de difícil acesso para a maioria dos pesquisadores, devido aos entraves éticos (BARBERO, 2009; FRANZ *et al*., 2011; VERBAAN *et al*., 2008).

Além disso essas amostras de pele normalmente são obtidas de uma variedade de locais anatômicos e após muitos estados de doenças diferentes, o que pode alterar a permeabilidade percutânea (HENNING; SCHAEFER e NEUMANN, 2009; KATTAN; ABSILL e HAIDAR, 2000; SCHMOOK; MEINGASSNER e BILLICH, 2001).

Contudo, a pele humana se apresenta como a membrana biológica mais recomendada de ser utilizada devido à sua permeabilidade reduzida do que a pele animal (ABD *et al*., 2016; BENAVIDES *et al*., 2020; FLATEN *et al*., 2015; NEUPANE *et al*., 2020).

Em conclusão, a pele humana *ex vivo* é o melhor modelo preditivo para estudos de absorção cutânea e, portanto, é conhecida como o padrão ouro em condições *ex vivo* (ABD *et al*., 2016; NEUPANE *et al*., 2020).

3.10.2 Mucosa vaginal

Uma ampla variedade de modelos animais pode ser sugerida como substitutos adequados à pele humana e estes têm sido utilizados para avaliar a permeação percutânea de moléculas. Em caso de substituição da pele humana, é sugerida uma escala de modelo animal, que pode ser aplicada para avaliar a permeação percutânea de substâncias, essa escala inclui: primata, rato, porco, porco da índia e cobra (GODIN e TOUITOU, 2007).

Vários estudos utilizaram ratos e camundongos de laboratório para estudos de irritação genital. No entanto, o revestimento vaginal espesso e queratinizado de roedores pode limitar a aplicação de resultados obtidos com este modelo para seres humanos (DAVIS *et al*., 2001). Entre os animais experimentais maiores, o porco tem a vantagem de ser notavelmente semelhante ao humano em termos de anatomia, fisiologia, metabolismo e patologia (SQUIER *et al*., 2008).

Para além da estrutura anatômica, também o pH, a secreção vaginal, a produção de muco cervical e a resposta inflamatória entre mucosa vaginal humana e a suína mostram semelhanças,

sugerindo o modelo suíno como o mais apropriado aos estudos *ex vivo* da mucosa vaginal (D'CRUZ *et al*., 2005; INFARMED, 2010).

Para realização de estudos de permeação *ex vivo* a utilização de mucosa vaginal da espécie suína revelou ser vantajosa frente a outras espécies, uma vez que é notavelmente similar à humana em termos de anatomia, fisiologia, metabolismo e patologia (IFRAMED, 2010).

3.10.3 Córnea bovina

Várias espécies, incluindo macacos, cavalos, porcos, cães, gatos, coelhos e roedores são utilizadas para avaliação de fármacos de uso ocular (BOUHENNI *et al*., 2012; PENNESI *et al*., 2012).

Experimentos com macacos requerem instalações laboratoriais especiais, tornando-os inacessíveis para a maioria dos pesquisadores. A córnea suína é utilizada devido à sua espessura e estrutura semelhantes às da córnea humana (RICHTER e KEIPERT, 2004).

Com relação a utilização de camundongos e ratos a principal desvantagem é o pequeno globo ocular, dificultando o acesso a manipulações clínicas. Já os coelhos têm olhos relativamente grandes, compartilhando muitas características anatômicas com seres humanos, incluindo o tamanho do globo ocular, sua estrutura interna e sistema óptico, características biomecânicas e bioquímicas, bem como o volume da cavidade conjuntiva (BOUHENNI *et al*., 2012; PENNESI *et al*., 2012). No entanto, o olho de coelho mostra diferenças distintas do olho humano, incluindo piscadas menos frequentes, que podem diminuir significativamente a drenagem pré-córnea de soluções topicamente aplicadas, e maior área superficial da córnea e conjuntiva (URTTI e SALMINENI, 1993).

Em relação aos olhos bovinos, além de serem facilmente obtidos em abatedouros de animais, são utilizados há anos nos campos da anatomia, fisiologia, bem como em práticas de dissecção, para o treinamento de técnicas oftalmológicas, além de sua utilização em métodos alternativos validados internacionalmente como o Teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP) (DOUGHTY, PETROU e MACMILLAN, 1995). Sendo assim, os olhos bovinos apresentam estruturas semelhantes aos olhos humanos (CHERUVU e KOMPELLA, 2006).

Nesse contexto, a córnea bovina é composta por cinco camadas: o epitélio, a membrana de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet o endotélio. Seu diâmetro é de cerca de 11,7 mm e sua espessura está entre 0,5 a 0,7 mm, sendo a córnea mais espessa no centro em relação ao limbo. A principal barreira que, normalmente, restringe a absorção de compostos pelos

olhos, é o epitélio (espessura 50 a 90 µm), uma vez que o estroma e endotélio, devido a suas naturezas aquosas, dificultam a permeação de compostos altamente lipofílicos (MUN *et al*., 2014). De semelhante modo, a córnea humana apresenta sua estrutura composta pelo epitélio (50 µm), pela membrana de Bowman (10 µm a 15 µm), pelo estroma (500 µm), pela membrana de Descemet (2,2 nm - 4,5 nm) e pelo endotélio (densidade celular 400 células/mm^2) (FRANCO, 2005).

O uso dos olhos bovinos se deve a eles estarem prontamente disponíveis em abatedouros, são de qualidade aceitável e têm baixo custo.

3.10.4 Mucosa de septo nasal

O porco tem sido amplamente utilizado como modelo em estudos que investigam a administração oral, ocular, transdérmica, intestinal e bucal de fármacos (WADELL *et al.*, 1999). A semelhança da anatomia (por exemplo, distribuição de células epiteliais) do sistema respiratório superior, incluindo a cavidade nasal de porcos e humanos, foi evidenciada em diversos estudos (RAJAO e VINCENT, 2015; IWATSUKI-HORIMOTO *et al.*, *2017*; STARBÆK *et al*., 2018; TARBÆK *et al.*, 2022).

Embora a morfologia das vias aéreas suínas seja mais cartilaginosa e varie um pouco de acordo com a idade e a raça, o trato respiratório suíno é um excelente modelo para a investigação de características da via respiratória humana, visto que as vias respiratórias superiores de porcos e humanos são anatomicamente semelhantes (RAJAO e VINCENT, 2015).

O uso de mucosa nasal suína viável provou ser bem sucedida para investigação *in vitro* em estudos de absorção (ÖSTH *et al.,* 2002). Existem várias vantagens associadas ao uso da mucosa suína, por exemplo, sua acessibilidade, pois pode ser coletada de animais pós abate. Além disso, destaca-se a obtenção de peças com superfície suficiente para montagem nas células de difusão (FRANSÉN *et al.*, 2007).

3.11 BIODISTRIBUIÇÃO DE SUSTÂNCIAS QUÍMICAS NOS OLHOS

O olho é dividido em várias estruturas anatômicas claramente diferenciadas que incluem a superfície ocular (córnea e esclera), a íris, o cristalino, o corpo ciliar, os humores aquoso e vítreo, coróide e retina (ALAMBIAGA-CARAVACA *et al*., 2023). Após instilação tópica de substâncias na superfície ocular pode ocorrer a permeação oftálmica de tal substancia, através

da passagem pela córnea, conjuntiva ou esclera (HUGHES *et al.,* 2005; KANG-MIELER *et al.*, 2014).

Apesar da fácil acessibilidade do olho, absorção de substancias através de sua superfície não ocorre de maneira tão fácil, principalmente devido às barreiras físicas existentes no olho, suas enzimas e ao curto tempo de residência das substâncias na superfície ocular (AGRAHARI *et al*., 2016).

As barreiras pré-corneanas são barreiras encontradas por substâncias antes de entrarem em contato com a córnea, sejam essas substâncias administradas topicamente ou substancias as quais o indivíduo venha a estar exposto (ONUGWU *et al*., 2023). Sendo essas barreiras o lacrimejamento, o ato de piscar e o fenômeno de drenagem nasolacrimal (WEN *et al*., 2019). Ou seja, quando uma substância chega ao olho por meio de gotas, uma alta porcentagem é eliminada ao piscar e diluída pelas lágrimas (MORRISON e KHUTORYANSKIY, 2014).

O olho humano é capaz de acomodar cerca de 7-30 µL de fluido sem derramar, logo qualquer volume acima deste que atinge a superfície ocular medicamento é perdida devido ao derramamento do fluido excessivo (VAM SANTVLIET *et al*., 2004; LUDWIG *et al*., 2021). Além desse volume ocular limitado, a taxa de renovação da lágrima humana de 14,9% a cada minuto minimiza o tempo de contato de substâncias com a superfície ocular (ONUGWU *et al*., 2023).

As barreiras teciduais, ou seja, a córnea, conjuntiva, esclera e coróide , representam resistência à passagem de substâncias através de junções epiteliais apertadas, matrizes de proteoglicanos e fibrilas de colágeno dentro de suas estruturas (ALQAWLAQ *et al*., 2014).

Duas vias possíveis disponíveis para os compostos atingirem os tecidos intraoculares são as vias transcorneana e a via conjuntiva/esclera. Na via transcorneana, as drogas se difundem através da córnea para o humor aquoso, onde a droga é distribuída para outros tecidos (ONUGWU *et al*., 2023). A principal via de absorção intraocular de drogas é a córnea, que atua como a segunda barreira física para a entrada de substâncias no olho, sendo projetada para impedir a entrada de moléculas e partículas estranhas (MOFIDAR *et al.*, 2021).

A córnea é uma estrutura transparente e barreira estrutural que cobre a frente do olho, ela se apresenta com uma pequena área de superfície (menos de 6% da superfície ocular) e é relativamente impermeável devido à sua estrutura multicamadas com combinação de camadas lipofílicas e hidrofílicas. O epitélio da córnea, estroma e endotélio são as principais barreiras estruturais para a entrada de substâncias no olho (BUCOLO *et al.*, 2008).

Na via transcorneana a substância se difunde através da córnea, da câmara anterior, através da pupila e na câmara posterior, depois passa pelas zônulas (corpos suspensórios) e no

vítreo, e finalmente passa através retina e camada de epitélio pigmentar da retina (RPE) para entrar na circulação sistêmica através da vasculatura coróide (GAUDANA *et al*., 2010; WENG *et al*., 2017).

A via alternativa para substâncias entrarem no olho após a instilação é a via não corneana que consiste na conjuntiva e na esclera (TSAI *et al.*, 2018). Em comparação com a córnea, a conjuntiva tem uma área de superfície maior (17 vezes maior), maior espaçamento intercelular e maior permeabilidade (RAMOS *et al.*, 2015). A difusão de substâncias através da esclera ocorre através dos espaços perivasculares e entre as fibrilas esclerais para eventualmente alcançar a coróide e, finalmente, atingir a retina (MOFIDAR *et al.*, 2021).

No entanto, a permeação de drogas oculares tópicas pela via conjuntival/escleral é considerada não produtiva. Isso se deve à presença de capilares sanguíneos e linfáticos, que reduzem a biodisponibilidade ocular ao produzir um fluxo considerável de drogas para a circulação sanguínea (ONUGWU *et al*., 2023).

3.12 TESTE DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE EM CÓRNEA BOVINA

A avaliação do potencial de irritação ocular é um parâmetro necessário na avaliação da segurança de produtos industriais e, portanto, faz parte dos requisitos do sistema regulatório internacional para o teste de produtos químicos (ADRIAENS *et al*., 2014). O teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) foi descrito pela primeira vez por Gautheron em 1992, que se baseou em métodos originalmente descritos por Muir e Tchao (VERSTRAELEN *et al.*, 2013).

O ensaio é um modelo organotípico que fornece a manutenção em curto prazo, da função fisiológica e bioquímica normal da córnea bovina *in vitro*. Assim, o dano causado à córnea pelo produto em teste é avaliado por meio das medidas quantitativas de alterações na opacidade da córnea e na permeabilidade à fluoresceína, sendo esses parâmetros avaliados por meio de um opacitômetro e um espectrofotômetro de luz visível, respectivamente (OECD, 2013).

Diante disso, o teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina, metodologia baseada no método de Muir (1984), tem o objetivo de avaliar o potencial irritante de um produto a partir da desnaturação proteica, precipitação celular ou inchaço estromal que culminam na opacidade na córnea bovina. Além de avaliar a relação que essas alterações provocadas podem ter como influência direta na permeabilidade dessa córnea. Os dados de opacidade da córnea bovina são obtidos através de leituras de opacidade que são realizadas durante o experimento e de acordo com o protocolo específico usando o opacitômetro OP-KIT, que se trata de um

opacitômetro de luz dupla (policromático), capaz de fornecer resultados pela leitura ponderada da transmissão de luz, medindo as mudanças na tensão quando a transmissão de luz branca altera à medida que passa através da córnea (VERSTRAELEN *et al*., 2013).

O teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) foi o primeiro método alternativo validado e aceito pelas agências reguladoras dos Estados Unidos que compõem o The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) como um teste para segurança oftálmica, em alternativa ao teste de irritação ocular de Draize, sendo aceito internacionalmente em 2009 pelo guia 437 da OCDE, que foi revisado e atualizado em 2013 (SCOTT *et al*., 2010). Atualmente, o BCOP é um método alternativo validado internacionalmente pelo EURL-ECVAM, reconhecido nacionalmente pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aceito pela ANVISA para fins regulatórios na avaliação do potencial de irritação ocular (BRASIL, 2014).

Entretanto, o BCOP apresenta algumas limitações. O método possui uma precisão geral de 79% quando usado para classificar a categoria 1 do sistema globalmente harmonizado de classificação (GHS) quando comparado ao teste de Draize. Essa perda de precisão foi associada às altas taxas de falsos positivos para álcoois, cetonas e materiais de teste sólidos, mas quando estes compostos são excluídos, a precisão do BCOP aumenta para 85% (OECD, 2009).

Desta forma o BCOP não é recomendado para a avaliação de produtos com baixo potencial irritante, visto que possui boa capacidade de predição apenas para produtos corrosivos ou com potencial irritante severo (DONAHUE *et al*., 201; OECD, 2009; OLIVEIRA *et al*., 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSUMOS

Os produtos comerciais obtidos para realização dos experimentos foram os agrotóxicos Rival 200 EC®, produto comercial contendo a substância ativa Tebuconazol 200g/L, obtido da Sumitomo Chemical e Comet 250®, produto comercial contendo a substância ativa Piraclostrobina 250g/L, obtido da Basf. Os agrotóxicos foram utilizados nos ensaios conforme indicação da bula dos respectivos produtos.

As substâncias químicas de referência utilizadas para as quantificações analíticas foram Folicur (*Tebuconazole*) 1000 µg/mL lote: 091021, com pureza de 99% e *Pyraclostrobin* 1000 µg/mL lote: 090921, com pureza de 99,5%, ambos obtidos da Absolute Standards, Inc. Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas, além de utilização de água obtida em sistema de ultra purificação Purelab, Elga, EUA.

4.2 SELEÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos avaliados neste estudo foram selecionados baseados em uma lista empírica de agrotóxicos mais utilizados na plantação de cebola, na região do Vale do São Francisco em Pernambuco, mais especificamente em Belém do São Francisco, onde foi realizado o estudo *in vivo*.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

4.3.1 Adaptação de método bioanalítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) para quantificação das amostras de Tebuconazol e Piraclostrobina

O método bioanalítico utilizado para quantificação das amostras dos estudos *in vitro* e *in vivo* foi adaptado de Park et al., 2021. A metodologia adotada foi por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Shimadzu Corp. Kyoto, Japão) acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo Sciex 3200 QTRAP (MDS-SCIEX, Toronto, Canadá).

O método de análise descrito por Park *et al*., 2021 utilizou coluna cromatográfica Kinetex C18 2.1 x 100 mm, 2.6 µm a temperatura de 40 ºC, com o volume de injeção de 4 µL. A fase

móvel utilizada foi composta fase orgânica metanol + ácido fórmico a 0,1% e fase aquosa formiato de amônio 5Mm + ácido fórmico a 0,1%, em um gradiente totalizando uma duração de 15 minutos de corrida analítica com fluxo de 0,3 mL/min.

4.3.2 Soluções estoque

As soluções estoque dos agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina foram preparadas a partir dos padrões Folicur (*Tebuconazole*) 1000 µg/mL e *Pyraclostrobin* 1000 µg/mL. Foi transferido um volume de 10 µL de cada padrão para um tubo Falcon® com capacidade de 15 mL, onde foi acrescido 9.990 µL de metanol. Obteve-se então soluções estoque, individuais, de concentração 1000 ng/mL de ambos os agrotóxicos.

4.3.3 Curva de calibração

Foram preparadas curvas de calibração dos agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina a partir das soluções estoque preparadas previamente na concentração de 1000 ng/mL. As curvas de calibração foram construídas nas concentrações de 10, 20, 50, 100, 200, 300, 500, 750 e 1000 ng/mL em metanol.

4.3.4 Preparo das amostras utilizadas para obtenção das condições espectrométricas e para otimização cromatográfica

As soluções dos agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina foram preparadas em metanol, a partir dos padrões dos mesmos. A solução preparada foi de 500 ng/ml, de concentração. A essa solução foi adicionado 0,1% de ácido fórmico com o objetivo de melhorar a ionização de ambos os compostos a serem analisados. As amostras foram sempre preparadas imediatamente antes do início dos experimentos.

Os parâmetros relativos à espectrometria de massas foram otimizados de acordo com características químicas de cada uma das moléculas, tais como a voltagem do capilar de ionização (IS), o potencial desagregante (DP), a energia de focalização dos íons (EP), as pressões dos gases responsáveis pela nebulização (GS1) e a evaporação das partículas do solvente (GS2), além das voltagens relativas à transmissão dos íons pelos quadrupolos, incluindo a energia de entrada na câmara de colisão (CEP), a energia de colisão (CE) e a energia

de saída da câmara de colisão (CXP). As infusões foram realizadas com o auxílio de bomba de infusão acoplada ao equipamento, com fluxo para ambas de 30 µL/min.

As condições cromatográficas foram ajustadas com relação as do método da literatura já citado. A mesma fase móvel foi utilizada, contudo a coluna cromatográfica e volume de injeção foram alterados. Além destes parâmetros, ajustou-se o método analítico para eluição isocrática, visto que o método é aplicado a multiresíduos e o presente trabalho teve o objetivo de analisar apenas dois agrotóxicos.

4.3.5 Processamento e Análise dos dados

Os dados foram obtidos utilizando software Analyst® 1.7 (Applied Biosystems, SCIEX, Toronto, Canadá) e processados através do software MultiQuant® 3.0 (Applied Biosystems, SCIEX, Toronto, Canadá).

4.4 ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR PARA AS DIFERENTES MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Para escolha do solvente extrator mais adequado a ser utilizado na extração de cada uma das membranas biológicas avaliadas nos ensaios de permeação (pele humana, mucosa vaginal e septo nasal suíno e estruturas oculares bovinas e suínas: córnea, íris, humor vítreo, coroide e retinas), foram testados diferentes solventes, entre eles o Metanol (MeOH), Acetonitrila (ACN), Metanol: Água (70:30), Metanol: Isopropanol (70:30).

A avaliação da extração foi realizada reduzindo as estruturas com auxílio de tesoura, sendo então armazenadas em microtubos para centrifuga (Eppendorf®). A essas estruturas foram pipetas 30 µL das soluções estoque a 1000 ng/mL, de cada um dos agrotóxicos avaliado. Em seguida os microtubos foram deixados abertos *over night.* Para secagem da solução.

No dia seguinte, foram pipetados volumes variáveis dos solventes extratores descritos acima e as amostras foram submetidas ao seguinte procedimento de extração: agitação em vórtex por 1 minuto, banho ultrassônico (SPLabor®) por 60 minutos, 12 horas de agitação em mesa agitadora e mais 1 minuto de agitação em vórtex. Após realizado esse procedimento, as amostras foram filtradas utilizando filtros de seringa de 0,45µm de PVDF (Millipore®).

4.5 OBTENÇÃO, TRANSPORTE, TRATAMENTO, E ARMAZENAMENTO DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO*

4.5.1 Pele humana

A pele humana utilizada nos estudos de permeação *in vitro* foi obtida mediante doação da pele retirada durante o procedimento de abdominoplastia, realizado no setor de cirurgia plástica do Hospital das Clínicas (HC-UFPE), com prévia autorização do médico responsável pelo setor. Para obtenção da pele humana houve autorização dos pacientes após explicação da finalidade da doação e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que foi em seguida assinado em duas vias e previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com número de CAAE: 56545822.2.0000.520.

O transporte, do material biológico do setor de cirurgia plástica do Hospital das Clínicas (HC-UFPE) para o laboratório, ocorreu em período de tempo inferior a 10 minutos, estando o material armazenado em caixa térmica apropriada para transporte, contendo gelo artificial para manutenção de temperatura adequada até a chegada no laboratório.

Após chegada ao laboratório a pele foi cuidadosamente inspecionada, através de uma avaliação visual, verificando-se a presença de tatuagens, marcas, cicatrizes, vermelhidões ou diferentes textura ou coloração. Caso apresentassem alguma das condições citadas, as áreas atingidas eram descartadas e as demais partes utilizadas.

A pele foi seccionada em secções (tiras) de aproximadamente 6-7 cm de largura, com auxílio de bisturi e tesoura cirúrgica, de modo a obter o melhor aproveitamento e facilitar o processo de dermatomização posterior. Em seguida, o excesso de gordura subcutânea foi removido e a pele lavada, visando limpar o excesso de sangue. Posteriormente a pele foi dermatomizada com o auxílio do equipamento dermatômetro Zimmer® *Electric Dermatome,* para obter secções de pele com espessura entre 400-700 μm.

Após padronização de sua espessura, a pele foi recortada em quadrados de aproximadamente 3 cm x 3cm. Cada recorte de pele teve sua espessura medida 3 vezes, utilizando um paquímetro digital (150mm-ZAAS), para obtenção da média da espessura. Estes dados foram incluídos na planilha de codificação e os fragmentos de pele foram armazenados em freezer a -20ºC até o momento de utilização.

4.5.2 Mucosa vaginal e de septo nasal suínos

O processo de coleta e transporte foi o mesmo para todas as mucosas utilizadas nesse estudo. O material foi adquirido em abatedouro local, no município de Paulista-PE, sendo coletado o mais breve possível após ser excisado do animal pós abate, sendo utilizadas mucosas de origem suína. O transporte desse material foi realizado em caixa térmica apropriada, contendo gelo artificial para manutenção de temperatura adequada até a chegada no laboratório.

Após chegada ao laboratório o material foi lavado em água corrente para remoção de sujidades. Em seguida, tanto a mucosa vaginal quanto a mucosa de septo nasal foram excisadas das vaginas e narinas suínas, respectivamente. Esse processo de excisão das mucosas foi realizado com auxílio de tesouras cirúrgicas, pinças e bisturis.

Após concluído o processo de retirada das mucosas, elas foram inspecionadas visualmente para avaliar a condição na qual se encontravam. As regiões que apresentavam machucados, cortes, orifícios, e ductos foram descartadas. As mucosas foram segmentadas em quadrados de aproximadamente 2cm x 2cm, tiveram sua espessura medida em triplicata utilizando um paquímetro digital (150mm-ZAAS). Em seguida, os fragmentos de mucosa foram lavados com soro fisiológico 0,9%, codificados e armazenados em freezer a -20ºC até o momento de utilização.

4.5.3 Córneas bovinas e suínas

A obtenção de córneas bovinas e suínas ocorreu de modo semelhante ao processo de obtenção das demais mucosas já citadas. Ao chegarem ao laboratório os olhos inteiros foram inspecionados visualmente para verificação da integridade dos mesmos. Verificou-se a presença de ferimentos, cortes e/ou deformidades que inviabilizassem sua utilização.

Uma vez considerados aptos após inspeção visual, os olhos inteiros foram lavados com soro fisiológico 0,9% e seguiram para o teste de permeação em olho inteiro descrito na sessão 4.9 ou, no caso do uso apenas das córneas, como no caso da permeação *in vitro* utilizando córneas bovinas, estas foram excisadas com auxílio de tesouras cirúrgicas, pinças e bisturis. Com o bisturi, foi feito um pequeno corte com cerca de 3 mm fora da córnea (esclera), em seguida corte em torno da córnea com uma tesoura cirúrgica, deixando uma borda de 2-3 mm de esclerótica. Todas as córneas utilizadas nos estudos de permeação *in vitro* foram utilizadas imediatamente após o procedimento de excisão, não sendo armazenadas para uso futuro.

4.6 PREPARO DOS SISTEMAS DISPERSOS DOS AGROTÓXICOS TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA

Foram preparadas diluições dos produtos, em duas diferentes concentrações para cada um dos agrotóxicos avaliados nesse estudo, sendo essas concentrações definidas de acordo com o previsto em bula dos produtos Rival 200 EC® e Comet 250®.

Para o Tebuconazol, produto Rival 200 EC®, foram preparados sistemas dispersos pipetando 25 µL e 50 µL do produto comercial em um balão volumétrico que teve seu menisco aferido para 25 mL, em seguida, foram levadas ao banho ultrassônico (SPLabor®) por 15 minutos. As dispersões emulsionadas obtidas possuíam concentração de 0,2mg/mL e 0,4mg/mL, respectivamente.

Para preparação dos sistemas dispersos de Piraclostrobina, produto Comet 250®, foram pipetadas 30 µL e 50 µL do produto comercial em um balão volumétrico que teve seu menisco aferido para 25 mL, em seguida, foram levadas a banho ultrassônico (SPLabor®) por 15 minutos. As dispersões emulsionadas obtidas possuíam concentração de 0,3mg/mL e 0,5mg/mL, respectivamente.

4.7 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO O SISTEMA DE CÉLULAS DIFUSÃO VERTICAL

Para os estudos de permeação *in vitro* utilizando o sistema de células difusão vertical foi utilizado o equipamento automatizado Vision ® Microette™ (figura 10) com volume de meio receptor de 6,0 mL e área de permeação 1,77 cm^2. O sistema de difusão vertical foi utilizado para avaliação da permeação em pele humana dos agrotóxicos utilizados neste estudo. A pele humana foi obtida, tratada e armazenada previamente, conforme já descrito.

Figura 10- Equipamento Vision ® Microette™.

Fonte: Acervo pessoal.

Água destilada a pH 6,0 (32±1°C) foi utilizada como solução receptora. Nesse ensaio, conforme descrito na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 294 de 29/07/2019, cada um dos agrotóxicos foi avaliado em três diferentes concentrações: produto concentrado e nas duas concentrações de trabalho. Para o Tebuconazol essas concentrações foram: 200g/L, 0,2mg/mL e 0,4mg/mL. Já para a Piraclostrobina essas concentrações foram: 250g/L, 0,3mg/mL e 0,5mg/mL.

Todos os ensaios foram realizados em sextuplicata, e em ambas as condições de produto concentrado ou diluído, foi aplicado um volume de 17,7 µL sobre a superfície da pele humana montada nas células de difusão verticais (células de Franz) (figura 11). Os intervalos de tempo estabelecidos para as coletas da solução receptora foram de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas, onde para cada intervalo foi amostrado automaticamente 1 mL da solução receptora, sendo esse volume reposto imediatamente após coleta.

As quantidades permeadas de agrotóxico no líquido receptor foram plotadas considerando a equação abaixo:

$$Q_{real,t} = Ct.Vr + \Sigma\, Vc.Cc$$

Onde:

$Q_{real,\,t}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t;

Ct = concentração obtida referente ao tempo t;

Vr = volume da solução receptora (6 mL);

Cc = concentração da amostragem anterior;

Vc = volume coletado.

O fluxo (J) foi calculado no estado de equilíbrio a partir do coeficiente angular da equação da reta gerada pelo gráfico da quantidade permeada por área versus tempo. O coeficiente de permeabilidade (K_p) foi calculado, por sua vez, dividindo-se o valor do J no estado de equilíbrio pela concentração de tebuconazol e piraclostrobina aplicada no compartimento doador (ÖZGÜNEY, *et al.*, 2006).

Figura 11- Células de Franz em experimento de permeação utilizando o equipamento Vision ® Microette™.

Fonte: Acervo pessoal.

Após 6 horas da permeação em curso, as superfícies das peles de cada célula de difusão foram limpas com swab de algodão seco (Olen®) e esses algodões foram armazenados em tubos Falcon® para posterior extração e quantificação do agrotóxico. Ao final das 24 horas de permeação, os fragmentos de pele foram removidos cuidadosamente das células de difusão e limpas com swab de álcool isopropílico 70% (Biosoma®). Estes swabs foram também armazenados em tubos Falcon® ou microtubo para centrifuga (Eppendorf®), para posterior extração e quantificação do agrotóxico.

As peles tiveram seu estrato córneo removido através do procedimento de *tape stripping*, onde um molde com área interna de 1,77 cm^2 foi utilizado para delimitar área a ser amostrada. Foram utilizadas 12 secções de fita adesiva (Scotch Book Tape, 3M Co., St. Paul, MN, USA)

para remoção do estrato córneo (figura 12), sendo agrupadas as fitas 1 e 2 e as fitas 3 a 12, armazenadas em tubos Falcon® ou em microtubos de centrifuga (Eppendorf®).

Figura 12- Fragmento de pele humana após ensaio de permeação cutânea fixada com agulhas e com molde para realização de *tape stripping.*

Fonte: Acervo pessoal.

Após remoção do estrato córneo cada fragmento de pele foi reduzido com auxílio de tesoura cirúrgica e armazenado em microtubos de centrifuga (Eppendorf®) para posterior procedimento de extração e quantificação, com o objetivo de verificar o percentual de agrotóxico retido na pele após finalização do estudo de permeação.

4.7.1 Procedimento de extração e preparo das amostras obtidas após realização do estudo de permeação cutânea *in vitro*

O procedimento de extração dos agrotóxicos a partir das diferentes amostras (algodões, fitas adesivas e fragmentos de pele), foi realizado após estudos de permeação *in vitro* utilizando o sistema de células de difusão vertical, ocorreu utilizando como solvente extrator o metanol, selecionado previamente.

Em todas as situações descritas as amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto, levadas a banho ultrassônico (SPLabor®) por 60 minutos e submetidas a mais 1 minuto de agitação em vórtex. Após realizado esse procedimento as amostras foram filtradas utilizando filtros de seringa de 0,45µm de membrana de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) (Millipore®).

4.8 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO O SISTEMA DE CÉLULAS DIFUSÃO HORIZONTAL (*SIDE-BY-SIDE*)

Um outro tipo de aparato também foi utilizado para os estudos de permeação *in vitro*, o sistema de células difusão horizontal, *side-by-side,* Permegear® (figuras 13 e 14). Nesse sistema, cada célula de difusão apresenta 3,4mL de volume de meio receptor e 0,65 cm^2 de área de permeação. O sistema de difusão horizontal foi utilizado para avaliação da permeação dos agrotóxicos nas mucosas vaginal e de septo nasal e córnea bovina.

Figura 13- Sistema de células de difusão horizontal, *side-by-side.*

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 14- Célula de difusão horizontal, *side-by-side.*

Fonte: Acervo pessoal.

Cada um dos agrotóxicos foi avaliado em duas diferentes concentrações. Para o Tebuconazol essas concentrações foram: 0,2mg/mL e 0,4mg/mL. Já para a Piraclostrobina essas concentrações foram: 0,3mg/mL e 0,5mg/mL. Todos os experimentos foram realizados em sextuplicata.

Como solução receptora utilizou-se água destilada a pH 6,0 (32±1°C), e nos compartimentos doadores das células de difusão horizontal foram aplicados um volume de 6,5 µL. Os intervalos de tempo estabelecidos para as coletas da solução receptora para a permeação vaginal foram: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas. Já para permeação com septo nasal suíno e córnea bovina os intervalos estabelecidos foram de 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas, onde para cada intervalo foi amostrado manualmente 1 mL da solução receptora, sendo esse volume imediatamente reposto após coleta.

Após decorrido o tempo do estudo de permeação, foi coletado também 1mL do conteúdo do compartimento doador para ser quantificada, a fim de se avaliar o balanço de massas posteriormente. Em seguida, os fragmentos de mucosa foram cuidadosamente retirados do sistema de difusão, picotadas em pequenos pedaços com auxílio de tesoura cirúrgica e armazenadas, individualmente, em microtubos para centrifuga (Eppendorf®) para posterior procedimento de extração e quantificação dos agrotóxicos.

4.8.1 Procedimento de extração e preparo das amostras obtidas após realização do estudo de permeação transmucosa e corneana *in vitro*

As mucosas e córneas obtidas ao final dos estudos de permeação *in vitro*, após serem picotadas e armazenadas, individualmente, em microtubos para centrifuga (Eppendorf®) foram extraídas com o solvente extrator, previamente determinado em avaliação de extração prévia. Para mucosa vaginal, o solvente extrator utilizado foi a acetonitrila e para a córnea bovina e septo nasal foi utilizado metanol como solvente no procedimento de extração.

As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto, levadas a banho ultrassônico (SPLabor®) por 60 minutos e submetidas a mais 1 minuto de agitação em vórtex. Após realizado esse procedimento, as amostras foram filtradas utilizando filtros de seringa de 0,45µm de PVDF (Millipore®).

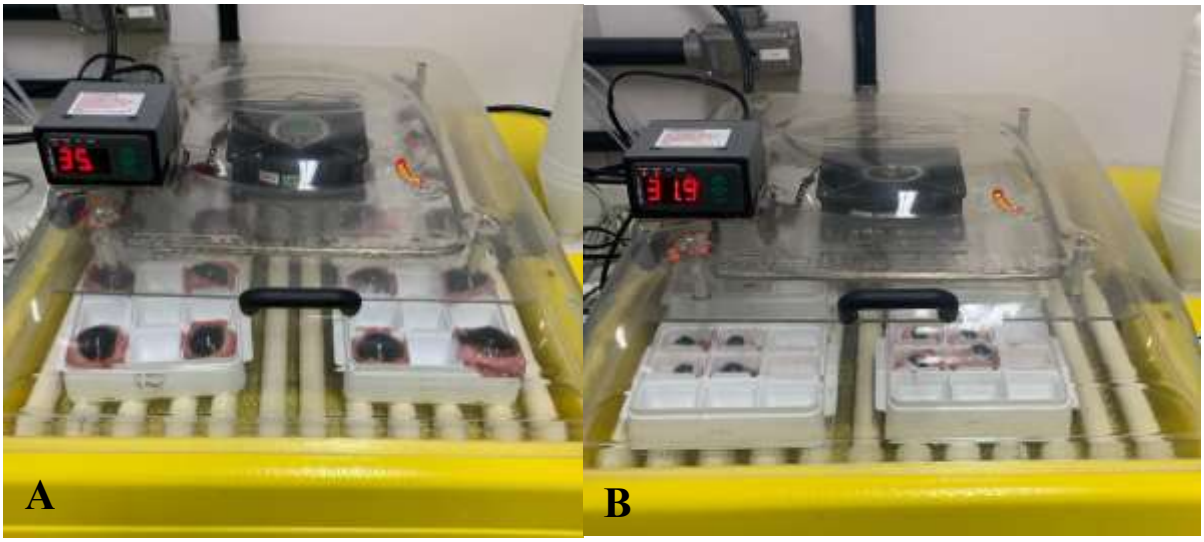
4.9 AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO OLHOS BOVINOS E SUÍNOS INTEIROS

O procedimento para coleta e transporte de olhos inteiros ocorreu de acordo com o já descrito previamente. O procedimento for realizado segundo Cardoso *et al.,* 2020, incluindo pequenos ajustes. Os olhos foram montados em suportes, de forma a permitir que permanecessem imóveis durante a realização do ensaio. Para os olhos bovinos aplicou-se 50µL

de soro fisiológico 0,9% na superfície do globo ocular para umedecer a região e logo em seguida foi aplicado também 50µL das dispersões emulsionadas dos agrotóxicos avaliados. Para o Tebuconazol 0,2mg/mL e 0,4mg/mL e Piraclostrobina 0,3mg/mL e 0,5mg/mL. Já para os olhos suínos os volumes aplicados foram de 25µL para o soro fisiológico 0,9% e as dispersões de agrotóxicos citadas.

Os suportes contendo os olhos inteiros foram postos em incubação em incubadora de ovos (Premium eco-friendly IP 70D) com temperatura e umidade controladas de 32°C e 65 ± 3%, respectivamente, durante todo o experimento (figura 15). Os intervalos de contato estabelecidos das dispersões dos agrotóxicos com os olhos inteiros foram: 15 minutos, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Para cada um desses intervalos de tempo o ensaio foi realizado em quadruplicata, ou seja, quatro olhos inteiros para cada intervalo de tempo. A cada intervalo estabelecido os olhos eram retirados para coletas de material.

Figura 15- (A) Olhos bovinos montados em suporte e postos em incubadora (B) Olhos suínos montados em suporte e postos em incubadora



Fonte: Acervo pessoal.

Em todos os intervalos de tempo estabelecidos foi realizada a coleta do humor aquoso de cada olho, bovino e suíno, visando avaliar o perfil de permeação e nos intervalos de tempo inicial e final (15 minutos e 2 horas) foi coletado para os bovinos a córnea, íris, humor vítreo, coroide e a retina para avaliação da biodistribuição dos agrotóxicos. Já para os olhos suínos foi coletada a córnea, esclera, íris, humor vítreo e a coroide.

O humor aquoso foi retirado com seringa de 1 mL e armazenado em vial para quantificação posterior dos agrotóxicos. Em seguida, as córneas foram excisadas

cuidadosamente com auxílio de bisturi e tesoura cirúrgica e armazenadas em microtubos para centrifuga (Eppendorf®) para procedimento de extração.

Após retirada da córnea, as demais estruturas foram também removidas com auxílio de pinça. Com exceção do humor aquoso, todas as demais estruturas foram pesadas e em seguida cortadas em pedaços menores com auxílio de tesoura cirúrgica para posterior realização de procedimento de extração do agrotóxico.

4.9.1 Procedimento de extração e preparo das amostras obtidas após realização do estudo de avaliação da biodistribuição *in vitro* utilizando olhos bovinos inteiros

Todas as estruturas obtidas ao final dos estudos de permeação *in vitro* utilizando olhos bovinos inteiros, após serem reduzidas com auxílio de tesoura cirúrgica e armazenadas individualmente, em recipientes já descritos previamente, foram extraídas utilizando metanol.

O metanol foi escolhido como solvente extrator por meio da realização de avalição de extração prévia.

As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto, levadas a banho ultrassônico (SPLabor®) por 60 minutos e submetidas a 12 horas de agitação em mesa agitadora. Após realizado esse procedimento as amostras foram filtradas utilizando filtros de seringa de 0,45µm de membrana de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) (Millipore®).

4.10 TESTE DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE EM CÓRNEA BOVINA (BCOP)

O procedimento para coleta e transporte de olhos bovinos inteiros se deu de forma semelhante ao já descrito previamente, contudo para manutenção da viabilidade dos olhos bovinos, em virtude da realização do BCOP, os olhos foram transportados imersos em solução de Hank's, estando o material armazenado em caixa térmica apropriada para transporte, contendo gelo artificial. Ao chegaram no laboratório, os olhos inteiros foram observados e avaliados, com objetivo de identificar qualquer injúria, como arranhões, manchas, vermelhidão e áreas opacas. Os olhos que apresentavam injúrias, foram descartados.

O teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina foi realizado de acordo com o guia 437 da OECD (2013). As córneas bovinas foram excisadas, montadas em câmaras especificas (*holders*), que são compostas de câmara anterior e posterior, para a realização do ensaio, sendo essas câmaras completamente preenchidas com *Minimum Essential Medium Eagle* (EMEM) sem fenol e incubadas para equilíbrio, em estufa, por 1 hora a 32 ± 1 °C.

Após esse período de incubação, foi realizada uma leitura inicial da opacidade de cada uma das córneas (opacidade pré-teste), com auxílio do opacitômetro (BASF-OP 3.0), que determina a transmissão do fluxo luminoso através da córnea, determinando um valor numérico de opacidade. As córneas que após o período inicial de uma hora de equilíbrio, apresentaram opacidade superior a sete unidades, foram descartadas.

O EMEM sem fenol foi removido da câmara anterior dos *holders* e então 750µL de amostra teste foram aplicadas nesta mesma câmara. Foram avaliadas as dispersões dos agrotóxicos Tebuconazol (0,2 e 0,4 mg/mL) e Piraclostrobina (0,3 e 0,5 mg/mL), assim como os produtos concentrados de cada um dos agrotóxicos (Tebuconazol 200 g/L e Piraclostrobina 250 g/L), em quadruplicata, além de NaCl 0,9% como controle negativo e NaOH 1%, como controle positivo. Os *holders* foram postos verticalmente, para que as amostras tivessem contato com a superfície das córneas, e permaneceram por um período de 10 minutos, em estufa a 32 ± 1ºC.

Em seguida, as córneas foram lavadas, com EMEM contendo fenol, para que houvesse a retirada completa das substâncias aplicadas. Após lavagem, as câmaras foram novamente preenchidas com EMEM sem fenol para serem incubadas por um período de 2 horas em estufa a 32 ± 1ºC. Após isso uma nova leitura de opacidade é realizada, sendo correspondente a opacidade pós-teste.

Para determinar a permeabilidade das córneas, após a medida de opacidade pós-teste o EMEM das duas câmaras dos *holders* foi removido e a câmara posterior ~~foi~~ preenchida com EMEM fresco. Foi adicionado 1 mL de solução de fluoresceína de sódio a 0,4% na câmara anterior, e então os *holders* foram novamente incubadas verticalmente a 32 ± 1ºC durante 90 minutos. Após esse tempo, o EMEM contido na câmara posterior foi removido e a densidade óptica a 490 nm (OD490) foi determinado por espectrofotômetro UV, a fim de verificar se houve passagem da fluoresceína através da córnea.

O cálculo final para obtenção do valor da irritação *in vitro* (IVIS) foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{IVIS} = \text{valor médio de opacidade} + (15 \times \text{valor médio de OD490})$$

De acordo com o protocolo OECD TG 437, as substâncias e produtos com valores de IVIS abaixo de 3, são classificados como sem categoria, ou seja, não irritantes. Nenhuma previsão pode ser feita quando os valores de IVIS estão entre 3 e 55 e acima desse valor, todas as substâncias são classificadas como categoria 1, ou seja, irritantes severos.

A classificação dos produtos foi dada de acordo com os valores obtidos e a tabela a seguir:

Tabela 1- Classificação das substâncias de acordo com o seu potencial irritante, segundo o teste BCOP.

Pontuação *in vitro*	**Classificação**
≤ 3	Sem categoria
>3 ≤ 55	Nenhuma previsão pode ser feita
> 55	Categoria 1

Fonte: OECD (2013).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ESTUDOS *IN VITRO*

A análise estatitisca dos resultados obtidos foi realizada por ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni e teste t-student não pareado. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p< 0,05$.

4.12 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE RESÍDUOS DE TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA EM AGRICULTORES

A avaliação de absorção cutânea *in vivo* foi previamente aprovada pelo Comitê de ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob número de CAAE: 56545822.2.0000.520.

As avaliações foram realizadas em cinco trabalhadores rurais e no pesquisador responsável no município de Belém do São Francisco- Pernambuco. Os trabalhadores avaliados foram aqueles que trabalham diretamente na atividade aplicação dos agrotóxicos nas lavouras, todos os participantes desta pesquisa possuíam faixa etária entre 18 e 40 anos, com peso e altura médios de 70 ± 2kg e 1,68 ± 0,03m, respectivamente.

Foram adquiridos os produtos comerciais Rival 200 EC® (Tebuconazol 200g/L) e Comet 250® (Piraclostrobina 250g/L). Cada um dos cinco aplicadores de agrotóxico preparou uma diluição dos produtos comerciais, conforme descrição contida na bula do fabricante dos produtos para aplicação em cultivo de cebola. O dispositivo de aplicação utilizado foi a bomba costal spray, popularmente conhecida como “mochila”, cada trabalhador avaliado utilizou uma bomba costal spray. A aplicação dos produtos ocorreu durante o horário de pulverização

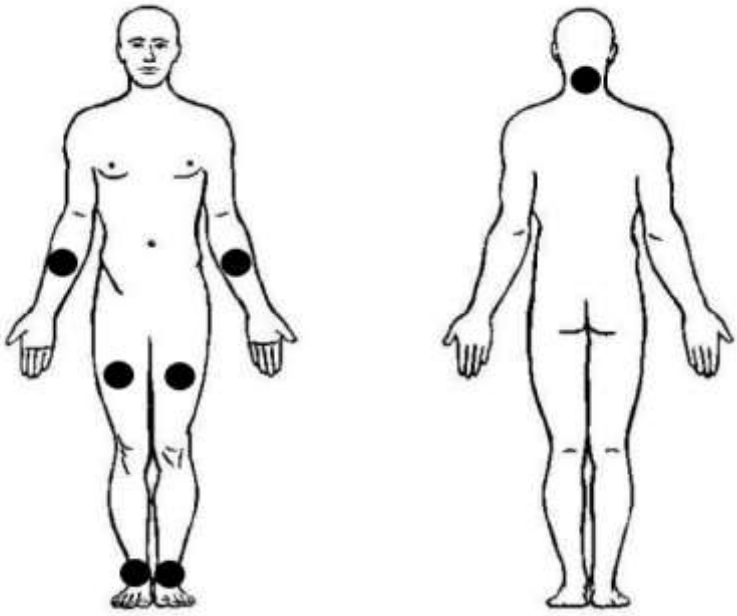
convencional. O período total de aplicação dos agrotóxicos foi de 4 horas contínuas, equivalente a meio dia de trabalho.

Cada trabalhador avaliado estava vestindo suas roupas de trabalho habituais, sendo eles mesmos os responsáveis pela aquisição e uso de equipamentos de proteção individual (EPI's), cabendo ao próprio trabalhador julgar se a vestimenta e EPI's utilizados por ele é adequado para o manuseio e aplicação do produto agrotóxico.

O estudo foi realizado conforme proposto por Araújo Cardoso (2020), utilizando duas abordagens diferentes para cada trabalhador, descritas a seguir:

- Uma seção de algodão com 1mm de espessura e 81 cm^2 (Needs®) de área exposta, simulando uma vestimenta, foi fixado em papel alumínio e, em seguida, fixado na roupa dos trabalhadores em diferentes regiões (nuca, antebraço direito, antebraço esquerdo, coxa direita, coxa esquerda, pé direito e pé esquerdo) (figura 16), antes do início da pulverização dos agrotóxicos nas lavouras. Essas secções de algodão são chamadas de *patchs*;

Figura 16- Representação da localização de fixação dos patchs de algodão nas vestimentas dos trabalhadores.

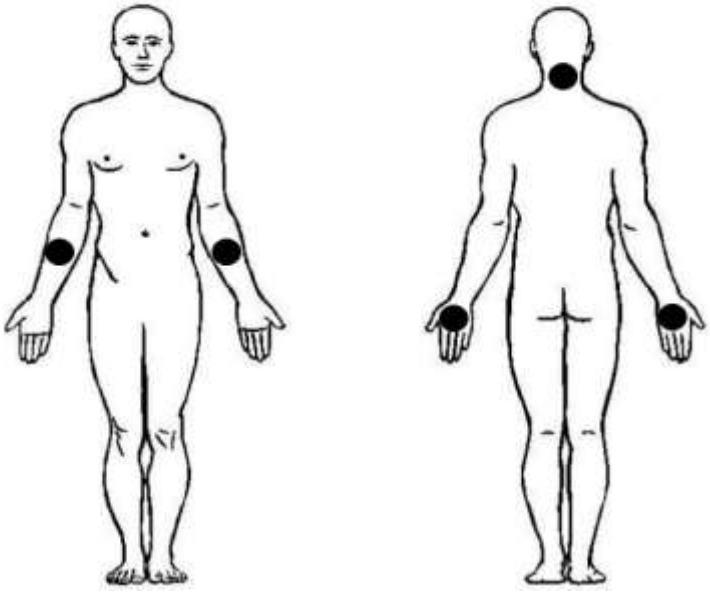


Fonte: Cardoso, 2020.

- A segunda abordagem avaliada foi a quantificação do estrato córneo de cada trabalhador avaliado após a finalização do procedimento de pulverização. Essa avaliação foi realizada pela técnica de *tape-stripping*, onde secções de fitas adesivas (Scotch Book Tape, 3M Co.,

St. Paul, MN, USA) foram utilizadas para coleta. Foram retiradas 5 secções de fita adesiva de cada área demarcada por molde com 1,77 cm^2 de área nas regiões: nuca, antebraço direito, antebraço esquerdo, mão direita e mão esquerda. Essa avaliação tem o objetivo de prever a permeação dos produtos através da pele. (figura 17)

Figura 17- Representação da localização onde foram realizadas coletas de *tape-stripping.*



Fonte: Cardoso, 2020.

Ao final da aplicação dos agrotóxicos, para cada trabalhador, todas as secções de algodão fixadas em suas vestimentas foram cuidadosamente removidas e armazenadas em tubos Falcon® com capacidade de 50 mL e mantidas a temperatura de -6 ºC até o momento de chegada ao laboratório para serem então extraídas e quantificadas.

Antes da realização da coleta do estrato córneo por meio da utilização de fitas adesivas, de acordo com o descrito, as regiões citadas foram limpas com swab de álcool isopropílico 70% (Biosoma®). Cada swab utilizado para limpeza prévia, assim como as fitas adesivas foram armazenados em microtubos para centrifuga (Eppendorf®) e mantidos a temperatura de -6 ºC até o momento de chegada ao laboratório.

Adicionalmente foi realizada a coleta de fluido lacrimal de cada um dos trabalhadores avaliados, em ambos os olhos. A coleta foi realizada com swab de algodão seco (Olen®). Os algodões foram removidos da haste plástica, armazenados em microtubos para centrifuga (Eppendorf®) e mantidos a temperatura de -6 ºC até o momento de chegada ao laboratório para extração e quantificação dos agrotóxicos.

4.12.1 Procedimento de extração e preparo das amostras dos estudos *in vivo*

O procedimento de extração das amostras de *patchs* de algodão, swabs e fitas geradas após realização da avaliação *in vivo* foi realizado utilizando como solvente extrator o metanol.

Os *patchs* de algodão foram extraídos utilizando 40 mL do solvente extrator e os swabs, fitas adesivas e algodões secos foram extraídos com 1 mL de metanol.

Em todas as situações descritas as amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto, levadas a banho ultrassônico (SPLabor®) por 60 minutos e submetidas a mais 1 minuto de agitação em vórtex. Após realizado esse procedimento as amostras foram filtradas utilizando filtros de seringa de 0,45µm de membrana de PVDF (Millipore®).

4.12.2 Cálculos

O potencial de exposição dermal dos agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina foi calculado de acordo com o guia da OECD de 1997 para o método de adesivos (OECD, 1997). Resumidamente, o valor quantificado dos agrotóxicos em µg/cm² foi multiplicado pelas áreas corporais regionais correspondentes para chegar à µg/região corporal. Então, a exposição dérmica potencial total foi calculada somando os dados com base nas secções de algodão.

Depois disso, de acordo com modificação feita por Andrade *et al.,* 2022 o percentual de dose tóxica foi calculado pela equação 1:

[$Equação\ 1$]

$$\frac{Exposição\ dermal\ (mg/h) + (Exposição\ respiratória\ (mg/h)\ x\ 10}{LD50\ (mg.kg^{-1})\ x\ 70}\ x\ 100$$

O fator de penetração (FP) dos agrotóxicos no estrato córneo foi estimado usando o cálculo descrito para o método de corpo inteiro no guia da OECD de 1997 (modificado por Andrade *et al.,* 2022). A equação 2, descrita abaixo, foi utilizada para avaliar os agrotóxicos quantificados na nuca, no braço, em algodão e no estrato córneo:

[$Equação\ 2$]

$$Fator\ de\ penetração\ (PF) = \frac{Agrotóxicos\ na\ fita}{Agrotóxicos\ no\ algodão + agrotóxicos\ na\ fita}\ x\ 100$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ADAPTAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS TRIPLO QUADRUPOLO (LC-MS/MS) PARA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA

5.1.1 Condições espectrométricas e cromatográficas

A primeira etapa de determinação das melhores condições espectrométricas relativa ao analisador de massas triploquadrupolo gerou os resultados descritos na tabela 2. Os dados foram obtidos coma fonte de ionização por eletronebulização (*Electrospray*) na polaridade positiva, como descrito por Park *et al.* 2021

.

Tabela 2- Melhores condições espectrométricas obtidas para os agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina.

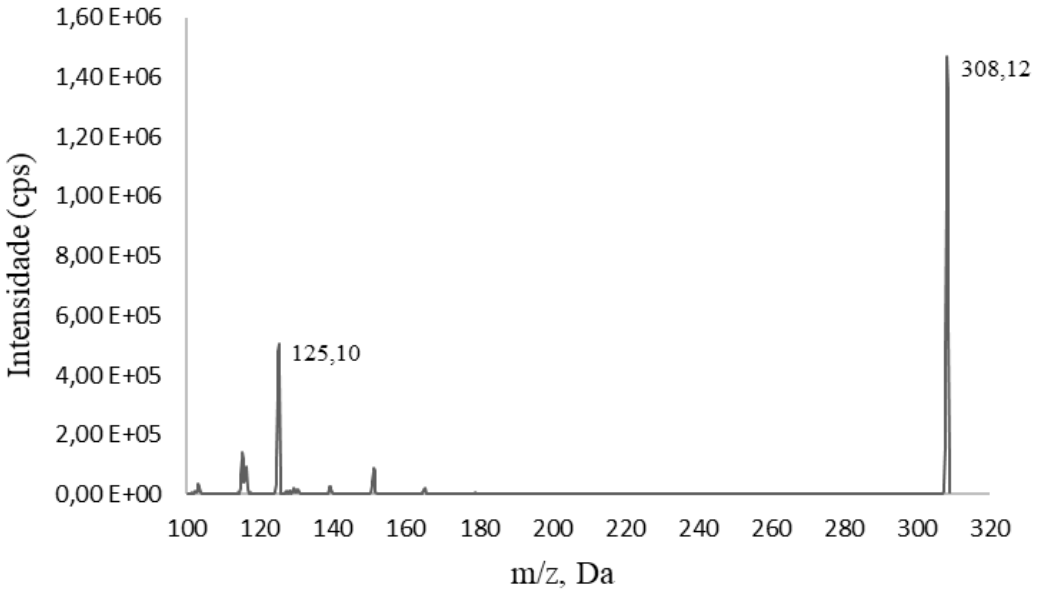
	Q1	**Q3**	**DP (volts)**	**EP (volts)**	**CEP (volts)**	**CE (volts)**	**CXP (volts)**
Tebuconazol	308.120	125.100	51.000	4.500	18.000	43.000	4.000
Piraclostrobina	388.086	163.300	31.000	5.500	28.000	27.000	4.000

Fonte: Autoria própria.

Após infusão direta de uma solução a 500ng/ml de cada um dos agrotóxicos avaliados neste trabalho foi possível a identificação e definição dos fragmentos mais intensos do Tebuconazol (figura 18) e da Piraclostrobina (figura 19). A ionização dos compostos foi realizada por eletro pulverização no modo positivo. O método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi obtido, através da otimização disponibilizada automaticamente pelo software Analyst®.

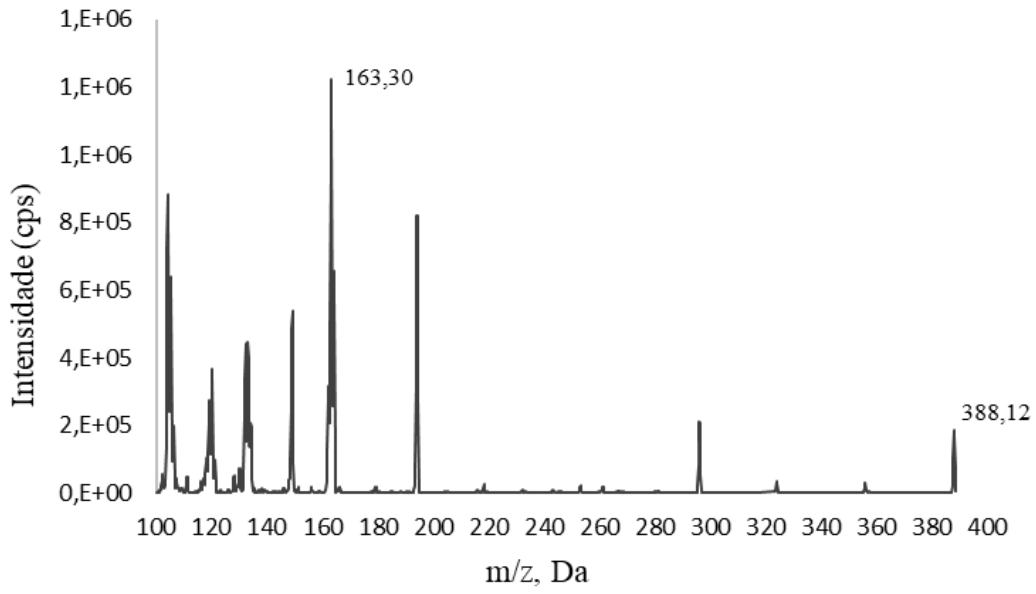
Para uma quantificação rápida e precisa de resíduos químicos a espectrometria (MS/MS) tem sido empregada de forma eficiente, com o modo de MRM de quadrupolos triplos. Essa técnica, aliada à cromatografia líquida (LC-MS/MS) tem sido utilizada recentemente para a determinação simultânea de multirresíduos de agrotóxicos (NARENDERAN *et al*., 2020).

Figura 18- Espectro de massa do Tebuconazol, com identificação de massa do Q1 (íon molecular precursor) e Q3 (íon molecular do fragmento mais intenso).



Fonte: Autoria própria.

Figura 19- Espectro de massa da Piraclostrobina, com identificação de massa do Q1 (íon molecular precursor) e Q3 (íon molecular do fragmento mais intenso).



Fonte: Autoria própria.

Com relação ao artigo base utilizado para otimização deste método analítico os pesquisadores utilizaram o equipamento Shimadzu LCMS-8050 e UHPLC Nexera. Os íons e

fragmentos mais intensos avaliados foram os mesmos que observamos na avaliação realizada neste trabalho, sendo as massas desses íons para o Tebuconazol Q1: 308 e Q3: 125 e para Piraclostrobina Q1: 388 e Q3: 163, corroborando com os resultados encontrados na nossa avaliação.

A coluna cromatográfica selecionada para utilização nesse estudo foi a C18 de 1,7µm Acquity UPLC® 2,1 x 100 mm (Waters) e uma pré-coluna C18 4 × 4 mm (5 µm) a 40 °C, mudando apenas o tamanho de partícula em comparação com a coluna cromatográfica utilizada por Park *et al.,*2021, a mesma temperatura de forno da coluna foi mantida.

A fase móvel utilizada foi a mesma utilizada no artigo base, sendo: como fase orgânica metanol + ácido fórmico a 0,1% e como fase aquosa formiato de amônio 5Mm + ácido fórmico a 0,1%, estando a uma proporção 70:30, respectivamente. O fluxo estabelecido foi de 0,3 mL/min, o volume de injeção 2 µL e curva de calibração com intervalo de 10 ng/mL-1000 ng/mL. Sendo o volume de injeção utilizado por nós menor do que o utilizado descrito no artigo base, de 4 µL.

Com relação a curva de calibração o artigo descreve um intervalo de curva de calibração de 12,5 ng/mL- 500 ng/mL, optamos por possuir um maior intervalo na curva de calibração deste trabalho, com o objetivo de evitar diluições das amostras analisadas, caso estivessem com concentração acima do ponto mais alto da curva, por isto estabelecemos 1000 ng/mL como o ponto mais alto da curva de calibração construída.

O tempo de retenção tanto para o Tebuconazol quanto para Piraclostrobina foi de 3,5 minutos e a corrida analítica teve uma duração total de 7 minutos, sendo um tempo obtido menor do que o do artigo base que possui 15 minutos de corrida cromatográfica. Essa diminuição de tempo de corrida é benéfica tanto para o meio ambiente quanto financeiramente. Para o meio ambiente um menor gasto de fase móvel implica em uma geração de uma menor quantidade de resíduos de solventes a serem descartados no meio ambiente. Além de que o tempo obtido de 7 minutos de corrida cromatográfica, sendo menos da metade do tempo de corrida original, de 15 minutos, representa uma economia financeira no valor total de solvente consumido a cada analise realizada.

Após estabelecimento das condições cromatográficas, uma nova avaliação foi realizada, sendo ela para otimização das condições da fonte de ionização. O experimento foi realizado através de injeção de amostras dos agrotóxicos na concentração de 500 ng/mL. Os dados obtidos após otimização das condições da fonte de ionização estão descritos na tabela 3.

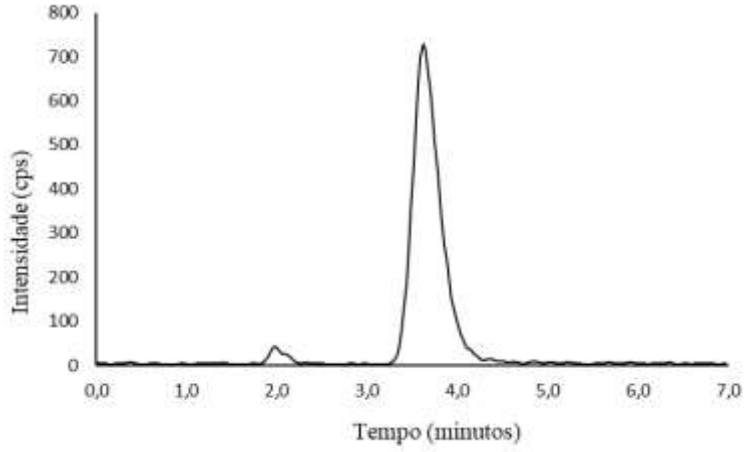
Tabela 3- Condições da fonte de ionização.

Parâmetro	Especificação
Gás de cortina (CUR)	15 psi
Voltagem Ion Spray (IS)	4500 V
Temperatura	500 ºC
GS1 (Gás de nebulização)	45 psi
GS2 (Gás de secagem)	45 psi

Fonte: Autoria própria.

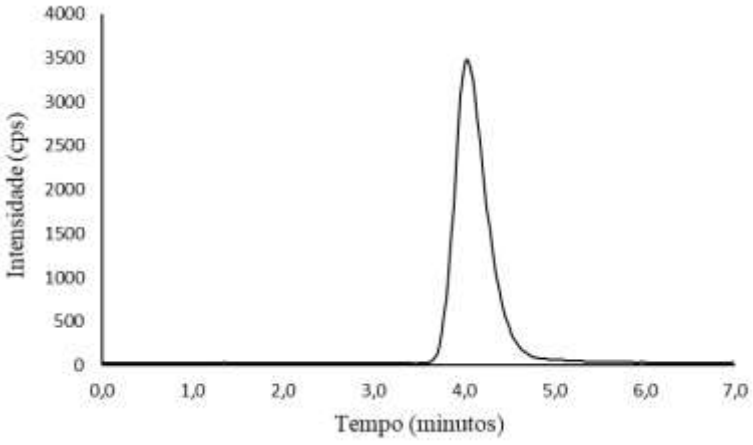
Os cromatogramas obtidos a partir da análise das soluções dos agrotóxicos a concentração de 500ng/ml, ponto médio da curva de calibração, estão listados nas figuras 20 e 21.

Figura 20- Pico cromatográfico do Tebuconazol.



Fonte: Autoria própria

Figura 21- Pico cromatográfico da Piraclostrobina.

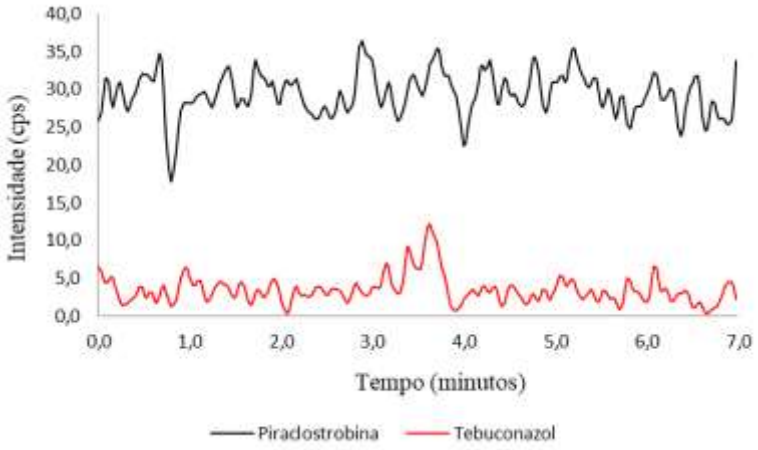


Fonte: Autoria própria

Após adaptação do método analítico foram realizadas análises de seletividade frente as matrizes biológicas analisadas durante o estudo. Foram analisadas amostras brancas (não contaminadas com os agrotóxicos) das seguintes matrizes: pele humana, mucosa vaginal e de septo nasal suínos, córnea bovina, humor aquoso, humor vítreo, íris, coroide e retina de olhos bovinos, fitas contendo extrato córneo, swabs de álcool e swabs secos.

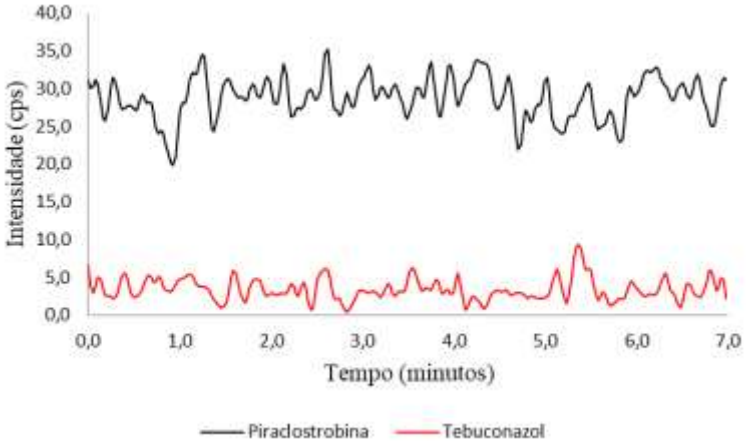
A análise de seletividade não evidenciou presença de sinal interferente nos tempos de retenção do Tebuconazol e da Piraclostrobina, conforme demonstrado nos cromatogramas abaixo (figuras 22 a 32). Deduz-se então que os constituintes das matrizes analisadas não interferem na quantificação dos agrotóxicos. Logo, a metodologia se apresenta seletiva para estas condições.

Figura 22- Cromatograma da análise branco de swabs secos.



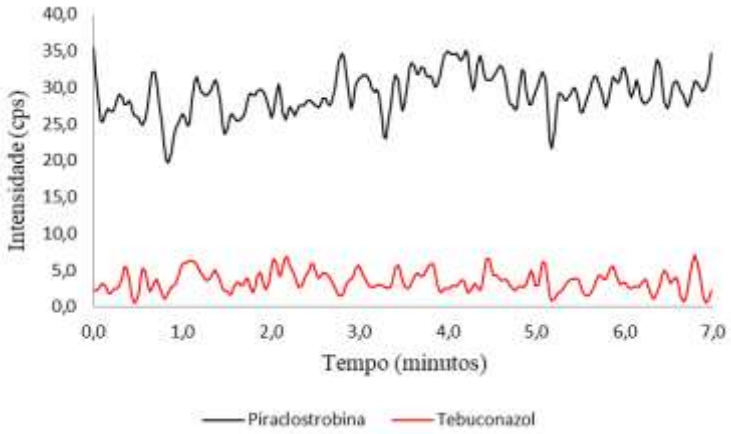
Fonte: Autoria própria.

Figura 23- Cromatograma da análise branco de swabs de álcool



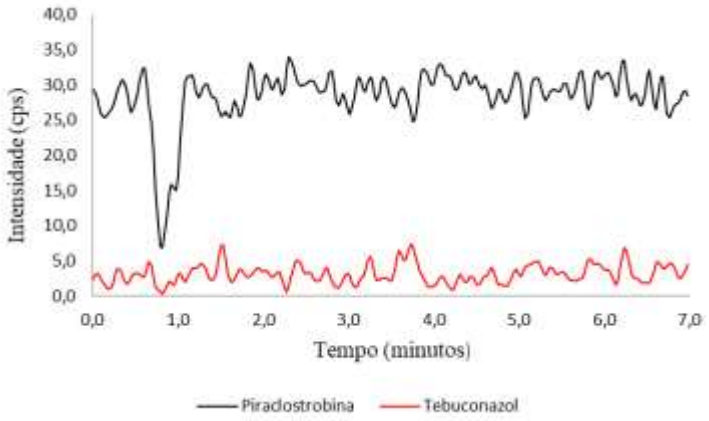
Fonte: Autoria própria

Figura 24- Cromatograma da análise branco de fitas adesivas contendo extrato córneo.



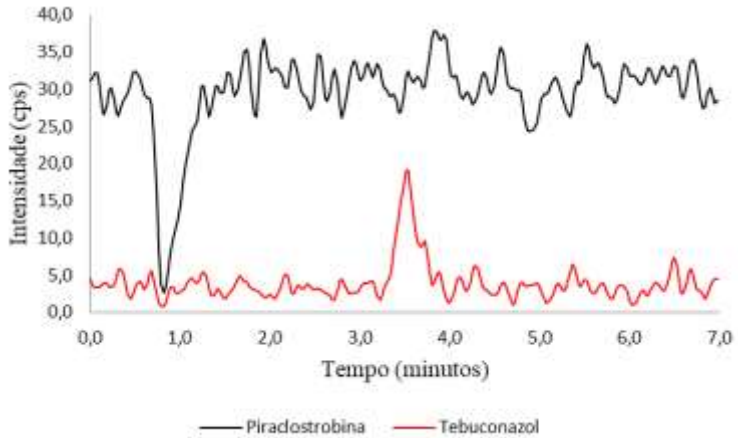
Fonte: Autoria própria.

Figura 25- Cromatograma da análise branco de pele humana.



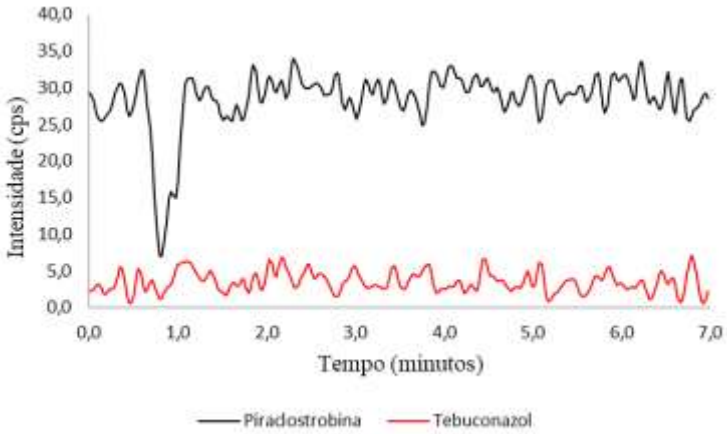
Fonte: Autoria própria.

Figura 26- Cromatograma da análise branco de mucosa vaginal suína.



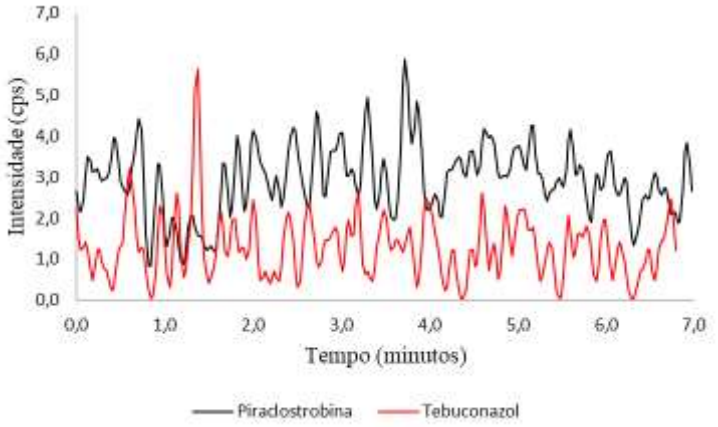
Fonte: Autoria própria.

Figura 27- Cromatograma da análise branco de córnea bovina.



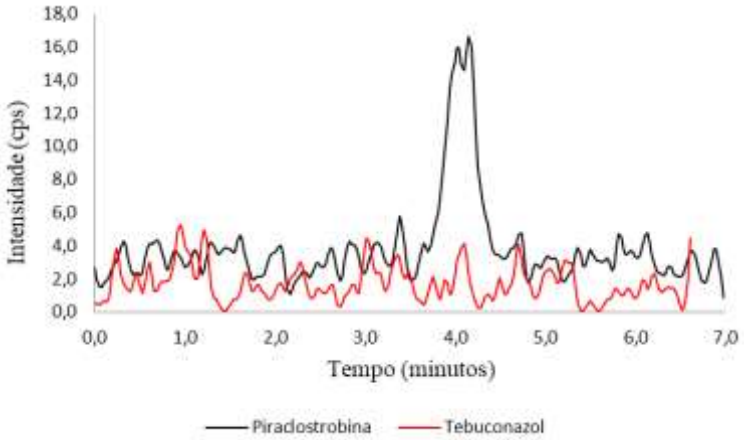
Fonte: Autoria própria.

Figura 28- Cromatograma da análise branco de humor aquoso bovino.



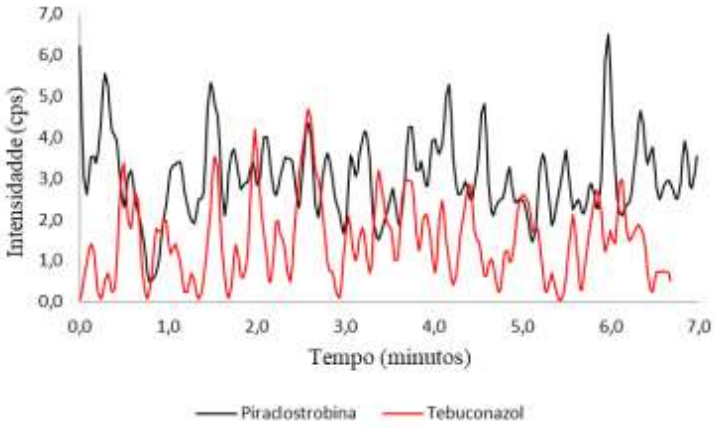
Fonte: Autoria própria.

Figura 29- Cromatograma da análise branco da íris bovina.



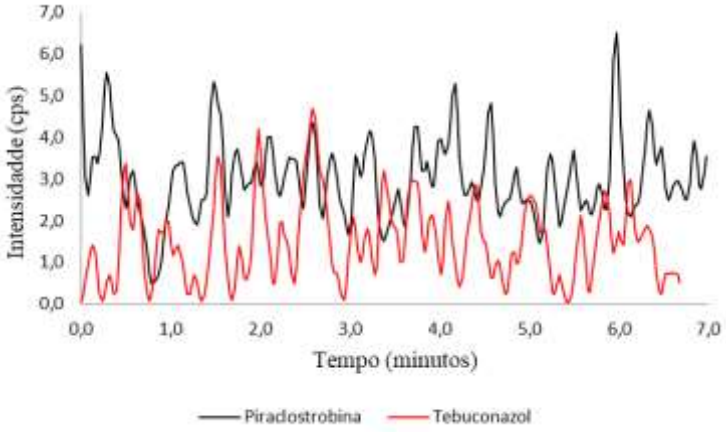
Fonte: Autoria própria.

Figura 30- Cromatograma da análise branco do humor vítreo bovino.



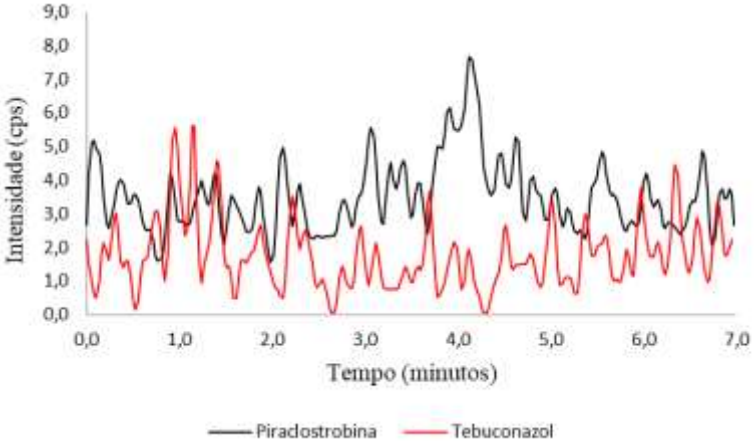
Fonte: Autoria própria.

Figura 31- Cromatograma da análise branco da coroide bovina.



Fonte: Autoria própria.

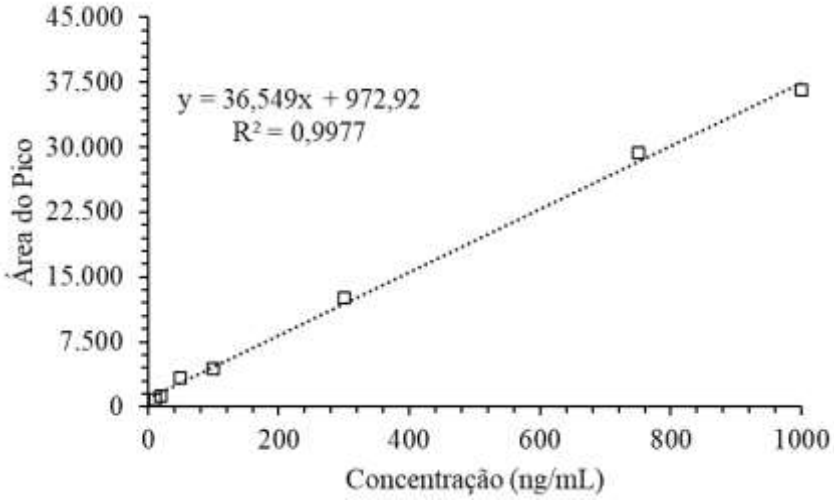
Figura 32- Cromatograma da análise branco da retina bovina.



Fonte: Autoria própria

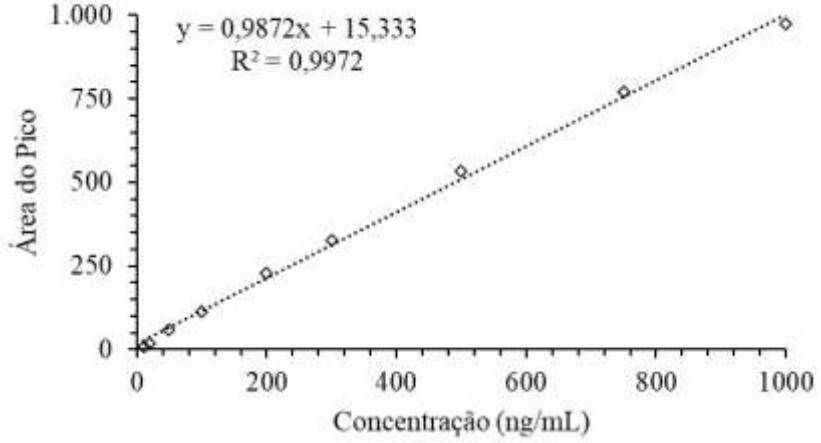
A linearidade no intervalo de calibração de 10 ng/mL a 1000 ng/mL, utilizado neste trabalho, foi avaliada a partir da obtenção da equação da reta (y) e do coeficiente de determinação da regressão (R^2), os resultados podem ser observados nas figuras 33 e 34.

Figura 33- Curva de calibração do Tebuconazol.



Fonte: Autoria própria.

Figura 34- Curva de calibração da Piraclostrobina.



Fonte: Autoria própria.

Os coeficientes de correlação obtidos, > 0.990 evidenciam que existe uma relação linear adequada para as curvas de calibração construídas, tanto para o Tebuconazol quanto para a Piraclostrobina.

5.2 ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR PARA AS DIFERENTES MEMBRANAS BIOLÓGICAS

A partir dos ensaios realizados para escolha do solvente mais adequado a ser utilizado para realizar extração em cada uma das membranas biológicas avaliadas neste trabalho, obteve-se os resultados descritos nas tabelas 4 e 5, sendo o solvente 1 (S1): Metanol, solvente 2 (S2): Acetonitrila, solvente 3 (S3): Metanol: Água (70:30), solvente 4 (S4): Metanol: Isopropanol (70:30). Os valores expressos nas colunas "M" correspondem a média e os valores expressos nas colunas "DP" aos desvios padrão.

Tabela 4- Dados de recuperação (%) de Tebuconazol obtidos a partir de extração das diferentes membranas biológicas com os solventes avaliado**s.**

Solventes/ membrana biológica	**S1**		**S2**		**S3**		**S4**	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Pele humana (%)	**98,8**	3,66	81,18	3,07	73,47	3,21	-	-
Fita adesiva (%)	**102,29**	4,73	95,42	2,53	74,14	3,47	-	-
Mucosa vaginal (%)	68,44	1,89	**89,28**	4,74	73,04	2,16	-	-
Mucosa de septo nasal (%)	**54,65**	5,17	50,78	5,24	43,94	5,16	-	-
Córnea bovina (%)	**104,59**	4,16	90,08	4,29	91,03	3,97	-	-
Iris bovina (%)	**82,84**	7,44	-	-	-	-	9,87	5,02
Humor vítreo bovino (%)	**30,33**	11,57	-	-	-	-	9,62	4,18
Coróide bovina (%)	**71,66**	4,29	-	-	-	-	4,57	5,19
Retina bovina (%)	**65,48**	6,15	-	-	-	-	8,94	5,46

Córnea suína (%)	**102,54**	18,08	-	-	-	-	-	-
Iris suína (%)	**104,21**	12,88	-	-	-	-	-	-
Humor vítreo suíno (%)	**7,39**	2,76	-	-	-	-	-	-
Coróide suína (%)	**103,37**	7,99	-	-	-	-	-	-
Esclera suína (%)	**57,75**	15,55	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5- Dados de recuperação (%) de Piraclostrobina obtidos a partir de extração das diferentes membranas biológicas com os solventes avaliados.

Solventes/ membrana biológica	**S1**		**S2**		**S3**		**S4**	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Pele humana (%)	**73,33**	1,04	40,44	2,92	68,45	3,33	-	-
Fita adesiva (%)	**76,60**	1,22	74,40	3,67	65,24	3,29	-	-
Mucosa vaginal (%)	67,26	3,93	**79,79**	1,69	71,08	1,54	-	-
Mucosa de septo nasal (%)	**48,36**	5,72	40,36	4,10	33,15	4,57	-	-
Córnea bovina (%)	**94,96**	3,64	92,06	2,94	90,52	3,01	-	-
Iris bovina (%)	**41,09**	1,44	-	-	-	-	23,94	5,12
Humor vítreo bovino (%)	**9,16**	0,85	-	-	-	-	22,14	6,19
Coróide bovina (%)	**48,31**	16,39	-	-	-	-	26,80	4,23
Retina bovina (%)	**66,20**	27,10	-	-	-	-	25,73	7,03

Córnea suína (%)	**32,59**	2,12	-	-	-	-	-	-
Iris suína (%)	**41,09**	1,44	-	-	-	-	-	-
Humor vítreo suíno (%)	**9,16**	0,85	-	-	-	-	-	-
Coróide suína (%)	**48,31**	16,39	-	-	-	-	-	-
Esclera suína (%)	**66,20**	27,10	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria.

Diante dos resultados percentuais de recuperação obtidos para as diferentes matrizes biológicas avaliadas neste trabalho, observados na tabela acima, o solvente metanol foi escolhido para realização de extração dos agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina em todas as matrizes analisadas, exceto para mucosa vaginal, nesta matriz o solvente extrator escolhido foi a acetonitrila.

O humor vítreo é composto por um líquido claro, transparente e semiviscoso que se encontra entre o cristalino e a retina. A composição é similar a do humor aquoso, mas com maior quantidade de ácido hialurônico (Wittwer *et al*., 1992). Apesar de 99% do humor vítreo ser água, o restante apresenta uma composição simples: ácido hialurônico e siálico, ácido ascórbico e láctico, glicose, alguns lipídeos, componentes inorgânicos, albuminas, globulinas e aminoácidos (Souza, 1997; Sánchez, *et al*., 2002).

Devido a composição do humor vítreo se caracterizar como uma estrutura geleificada, a extração de compostos desta malha de gel necessitaria de um procedimento extrativo especifico. Diante disto, justifica-se os baixos percentuais de recuperação dos agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina encontrados na estrutura do humor vítreo.

5.3 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO O SISTEMA DE CÉLULAS DIFUSÃO VERTICAL

Nos ensaios de permeação *in vitro* utilizando o sistema de células difusão vertical foi utilizada a pele humana como membrana biológica, conforme recomendação da RDC 294 de 29/07/2019. O perfil de permeação dos agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina foi determinado após realização dos ensaios de permeação por um período de 24 horas. Cada um

dos agrotóxicos foi avaliado em sextuplicata para três diferentes concentrações entre eles o produto concentrado (200g/L e 250g/L para o Tebuconazol e a Piraclostrobina, respectivamente), e nas duas concentrações das soluções de trabalho (0,2mg/mL e 0,4mg/mL para o Tebuconazol e 0,3mg/mL e 0,5mg/mL para a Piraclostrobina).

As tabelas 6, 7 e 8 mostram, separadamente, a quantidade de cada um dos agrotóxicos permeada através da pele, recuperada no estrato córneo, retida na epiderme restante + derme, além da quantidade de agrotóxico presente no swab de algodão seco, utilizado para limpeza da superfície da pele após 6 horas do ensaio de permeação.

Tabela 6- Quantidades de Tebuconazol encontradas em diferentes locais após estudo in vitro de permeação em pele humana, a partir das concentrações de 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL.

Quantidade de Tebuconazol aplicada	**0,2 mg/mL**			**0,4 mg/mL**		
	Média	**DP**	**CV%**	**Média**	**DP**	**CV%**
Swab de algodão (ng)	303,34	5,33	1,75	358,26	60,72	16,95
Estrato córneo (ng)	637,16	46,19	7,24	1471,97	92,76	6,30
Retido na pele (ng)	217,05	13,11	6,04	375,08	9,58	2,55
Total permeado (ng)	128,30	16,45	12,82	292,70	33,76	11,53
Quantidade total recuperada (%)	98,91	3,40	3,45	96,078	0,70	0,73

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7- Quantidades de Piraclostrobina encontradas em diferentes locais após estudo in vitro de permeação em pele humana, a partir das concentrações de 0,3 mg/mL e 0,5 mg/mL.

Quantidade de Piraclostrobina aplicada	**0,3 mg/mL**			**0,5 mg/mL**		
	Média	**DP**	**CV%**	**Média**	**DP**	**CV%**

Swab de algodão (ng)	2863,33	294,19	10,27	4876,04	141,01	2,89
Estrato córneo (ng)	1517,01	221,52	14,60	2835,96	209,34	7,38
Retido na pele (ng)	806,18	133,49	16,55	653,42	74,03	11,32
Total permeado (ng)	5,61	0,50	8,98	8,28	1,56	18,87
Quantidade total recuperada (%)	97,78	2,14	2,19	97,30	0,76	0,79

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8- Quantidades de Tebuconazol e Piraclostrobina encontradas em diferentes locais após estudo in vitro de permeação em pele humana, utilizando os produtos concentrados nas concentrações de 200 g/L e 250 g/L, respectivamente.

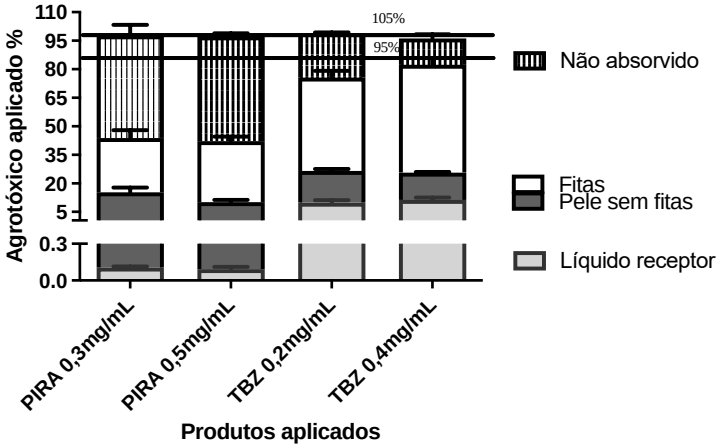
Quantidade de produto aplicado	**Tebuconazol 200g/L**			**Piraclostrobina 250 g/L**		
	Média	**DP**	**CV%**	**Média**	**DP**	**CV%**
Swab de algodão (ng)	964185,97	316575,33	32,83	3077638,33	98004,7	3,18
Estrato córneo (ng)	451727,72	38345,61	8,48	989628,56	100121,44	10,11
Retido na pele (ng)	150447,06	2435,39	1,618	346480,36	41924,43	12,1001
Total permeado (ng)	1417,6336	211,66	14,93	10,32	0,73	7,07
Quantidade total recuperada (%)	95,28	9,54	21,55	99,74	1,12	1,24

Fonte: Autoria própria.

A figura 35 mostra a distribuição da Piraclostrobina e do Tebuconazol em cada compartimento do sistema de difusão quando da aplicação dos produtos diluídos e as figuras 36 e 37 mostram o perfil cumulativo da Piraclostrobina e do Tebuconazol (ng/cm^2), permeado

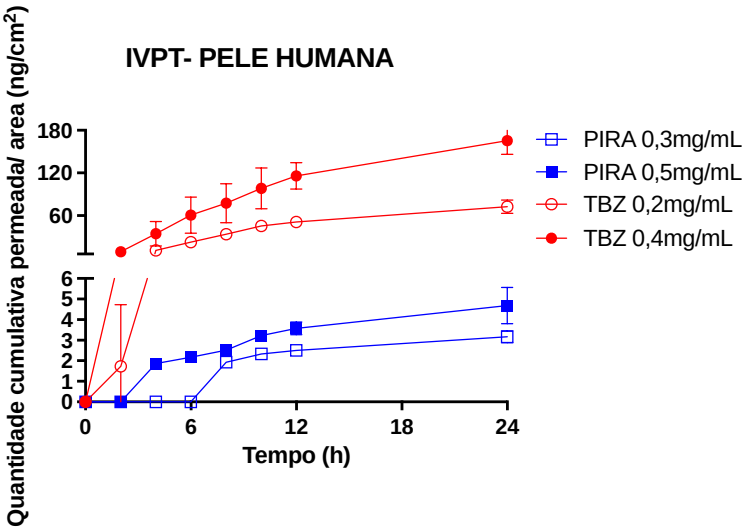
para os produtos diluídos e para o produto concentrado, respectivamente, quando aplicadas sob a pele humana, no experimento de 24 horas.

Figura 35- Distribuição do Tebuconazol e da Piraclostrobina em cada parte do sistema de difusão como resultado de 6h de exposição de Rival 200g/L e Comet 250g/L, 24h de tempo total do experimento, em pele humana (n= 6).



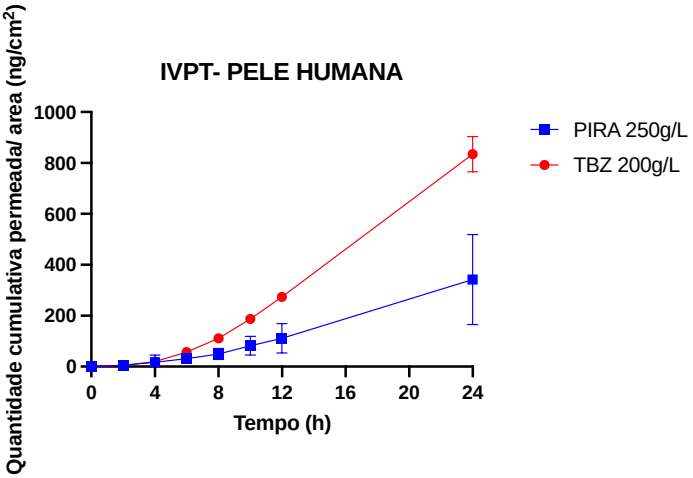
Fonte: Autoria própria

Figura 36- Perfil cumulativo de Piraclostrobina e Tebuconazol permeado (ng/ cm²) em experimento de 24 horas utilizando pele humana com aplicação de 17,7 µL das soluções diluídas dos agrotóxicos (N = 6).



Fonte: Autoria própria.

Figura 37- Perfil cumulativo de Piraclostrobina e Tebuconazol permeado (ng/ cm²) em experimento de 24 horas utilizando pele humana com aplicação de 17,7 µL dos produtos agrotóxicos concentrados (N = 6).



Fonte: Autoria própria

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,5$) na quantidade total permeada, entre as diferentes concentrações de cada agrotóxico aplicado. Mesmo as quantidades totais de Tebuconazol aplicadas sendo menores que as de Piraclostrobina, seu perfil de permeação através da pele humana demonstrou ser superior ao da Piraclostrobina. A quantidade de Piraclostrobina no líquido receptor correspondeu a 7,13 ± 1,67% e 0,95 ± 0,25 % da quantidade retida na pele quando da aplicação das concentrações de 0,5 mg/mL e 0,3 mg/mL, respectivamente. Vale salientar que o experimento foi realizado em condição de não saturação, mas, ao mesmo tempo, não foi realizado em condições sink considerando a definição da literatura como condição sink sendo definida pela United States Pharmacopoeia (USP, 2016) como uma condição com volume de meio equivalente a no mínimo três vezes o volume de meio necessário para formar uma solução saturada da substância.

Já para o Tebuconazol a quantidade no líquido receptor correspondeu a 78,00 ± 8,01 % e 59,42 ± 9,80% da quantidade retida na pele quando da aplicação das concentrações de 0,4 mg/mL e 0,2 mg/mL. Isto demonstra um processo de eliminação da pele mais rápida para o Tebuconazol comparado a Piraclostrobina, levando a crer que este produto pode ser absorvido sistemicamente em maior nível, tornando seu uso mais criterioso. Para uma maior compreensão e certeza desta afirmação, seria necessária a avaliação *in vivo* dos metabólitos do Tebuconazol (Hidroxi-Tebuconazol (TEB-OH) e Carboxi-Tebuconazol (TEB-COOH)) na urina e/ ou cabelo (OERLEMANS *et al.,* 2019; IULC *et al.,* 2022; POLLEDRI *et al.,* 2019). Contudo, não foi

possível a avaliação de amostras biológicas como cabelo e urina neste trabalho devido a indisponibilidade no mercado de padrões dos metabolitos gerados pelos agrotóxicos, mesma dificuldade relatada por Dereumeaux *et al.,* 2022.

É importante notar que o fluxo de permeação do Tebuconazol (ng/cm^2/h) mostrou-se linear e maior até 12hs do experimento (2,6 e 2,9 vezes para as concentrações de 0,4 mg/mL e 0,2 mg/mL, respectivamente), mesmo o tempo de contato da formulação com a pele tendo sido de apenas 6h, comparado ao restante do tempo do experimento (entre 12-24 h). Para os produtos contendo Piraclostrobina, o fluxo de permeação (ng/cm^2/h) mostrou-se também linear e maior até 12hs do experimento (2,4 vezes para ambas as concentrações de 0,5 mg/mL e 0,3mg/mL respectivamente), comparado ao restante do tempo do experimento (entre 12-24 h). No cálculo do balanço de massa, a recuperação da Piraclostrobina e do Tebuconazol foi entre 95-105%, demonstrando reprodutibilidade na execução da metodologia.

Para analisar a absorção cutânea *in vitro* de agrotóxicos, a legislação brasileira vigente, a RDC 294 de 2019 segue o procedimento descrito na OCDE 428 (2004). No entanto, na CP 987/20, que trata da avaliação de risco ocupacional, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2020) estabelece que estudos de absorção dérmica devem ser realizados *in vitro* utilizando pele humana ou através de procedimento triple pack utilizando pele de rato, segundo protocolo da EFSA (2017).

De acordo com a EFSA (2017), no estudo IVPT, "se o período de amostragem for 24h e pode-se concluir com confiança que mais de 75% da permeação ocorreu dentro da metade da duração do período total de amostragem, o cálculo da absorção é relatado como: Absorção = solução receptora + lavagens da câmara receptora + pele (excluindo todas as fitas)". Caso isto não ocorra, a quantidade de agrotóxico retido nas fitas deve também ser incluído no cálculo, exceto as fitas 1 e 2 (material que não se tornará biodisponível devido a descamação).

Portanto, seguindo esta afirmação, conforme descrito acima, o percentual de absorção calculado em pele humana foi de 47,01 ± 3,17%; 61,47 ± 2,11% e 51,08 ± 2,89 para os produtos de Tebuconazol diluídos (0,4mg/mL e 0,2mg/mL, respectivamente) e concentrado. Já para a Piraclostrobina, o percentual de absorção calculado na pele humana foi de 32,13 ± 2,38; 28,67 ± 4,16 e 59,47 ± 3,45 % para os produtos diluídos (0,5mg/mL e 0,3mg/mL, respectivamente) e concentrado. Vale salientar que aproximadamente 70 % do Tebuconazol foi absorvido após 12hs do experimento, quando comparado com o tempo total de estudo (24hs). Ou seja, neste cálculo de percentual de absorção, foi levado em consideração a quantidade de agrotóxico retido nas fitas 3-12. Já com relação a Piraclostrobina, aproximadamente 80% do total de agrotóxico

permeou em 12hs do experimento (metade do tempo total), não sendo, portanto, necessária a inclusão da quantidade de agrotóxico retida em nenhuma das fitas. De acordo com a EFSA, 2017, se a quantidade permeada no tempo de 12h for ″próximo″ de 75% do total de 24h de estudo, um intervalo de confiança deve ser estimado para demonstrar credibilidade na conclusão de que a permeação é essencialmente completa. A mesma avaliação realizada para o Dimetoato revelou um percentual de absorção de 14,75%. (ANDRADE, 2022). O valor padrão a ser utilizado na ausência de dados experimentais para estes tipos de produto é de 70% para o produto diluído e de 25% para o produto concentrado (EFSA, 2017). Esses resultados demonstram a importância da boa condução do IVPT e da utilização da pele humana.

5.4 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO O SISTEMA DE CÉLULAS DIFUSÃO HORIZONTAL (SIDE-BY-SIDE)

Os ensaios de permeação *in vitro* utilizando o sistema de células difusão horizontal utilizaram como membranas biológicas as mucosas vaginais suína, septo nasal suíno e córnea bovina, tratados previamente.

A avaliação do perfil de permeação dos agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina se deu por meio da realização de ensaios de permeação com um período de duração de 4 horas exceto para permeação vaginal que foi de 8hs, considerando a carga horaria de trabalho diário. Os ensaios foram realizados em sextuplicata e nas concentrações de diluições de ambos os agrotóxicos estudados.

5.4.1 Estudo de permeação *in vitro* utilizando mucosa vaginal suína

As tabelas 9 e 10 demostram, a quantidade de cada um dos agrotóxicos permeada e retida na mucosa vaginal após finalizado o estudo, e o doseamento da quantidade de agrotóxico presente no compartimento doador também ao final do estudo, visando calcular o balanço de massas.

Tabela 9- Quantidade de Tebuconazol encontrada no estudo de permeação nas concentrações de 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL.

Quantidade de Tebuconazol aplicada	**0,2 mg/mL**	**0,4 mg/mL**

	Média	DP	CV%	Média	DP	CV%
Retido na mucosa (ng)	209,42	83,25	39,75	614,43	211,96	34,49
Total permeado (ng)	117,65	137,63	58,82	254,86	73,85	30,65
Compartimento doador (ng)	875,21	15,20	1,73	1668,60	129,09	7,73
Quantidade total recuperada (%)	92,48	5,01	4,94	97,61	1,44	1,49

Fonte: Autoria própria

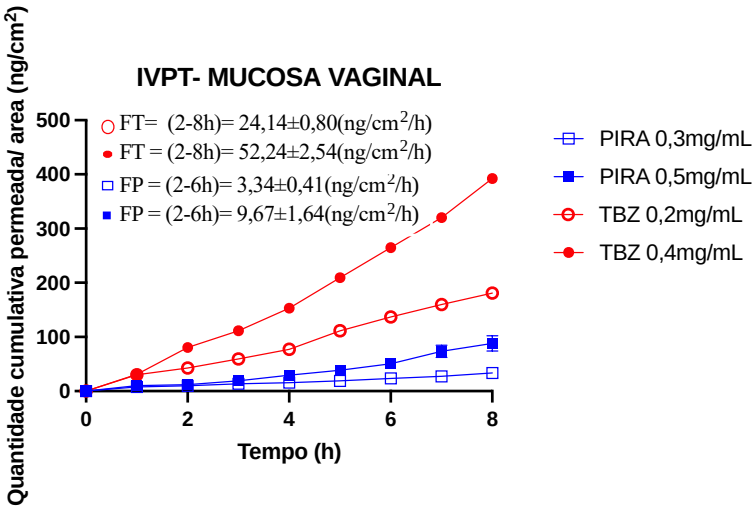
Tabela 10- Quantidade de Piraclostrobina encontrada no estudo de permeação nas concentrações de 0,3 mg/mL e 0,5 mg/mL.

Quantidade de Piraclostrobina aplicada	**0,3 mg/mL**			**0,5 mg/mL**		
	Média	**DP**	**CV%**	**Média**	**DP**	**CV%**
Retido na mucosa (ng)	820,67	137,48	16,75	1460,31	213,68	14,63
Total permeado (ng)	21,92	3,01	13,73	57,22	9,19	16,07
Compartimento doador (ng)	1078,88	125,31	11,61	1703,17	205,22	12,04
Quantidade total recuperada (%)	98,53	0,67	0,68	99,09	0,48	0,49

Fonte: Autoria própria.

No cálculo do balanço de massa, a recuperação do Tebuconazol e da Piraclostrobina foi entre 95-105%, demonstrando reprodutibilidade na execução da metodologia. O perfil de permeação do Tebuconazol e Piraclostrobina obtido a partir da análise dos dados é o demonstrado na figura 38.

Figura 38- Perfil cumulativo do Tebuconazol e Piraclostrobina permeado (ng/ cm²) em experimento de 8 horas utilizando mucosa vaginal suina com aplicação de 6,5uL das soluções diluídas dos agrotóxicos, respectivamente (N = 6). FT: fluxo de Tebuconazol. FP: fluxo de Piraclostrobina.



Fonte: Autoria própria.

Seguindo um perfil semelhante a permeação através da pele humana, na permeação através de mucosa vaginal suína, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ANOVA one way ($p < 0,5$) na quantidade total permeada, entre as diferentes concentrações de cada agrotóxico aplicado. No entanto, o percentual permeado a partir de ambas as diluições do produto contendo Tebuconazol foi similar e de ~10% do total aplicado. Já o percentual permeado a partir das diluições do produto contendo Piraclostrobina foi cerca de 1,76±0,28 e 1,12 ± 0,15% a partir do produto contendo 0,5mg/mL comparado ao produto contendo 0,3 mg/mL. Mesmo as quantidades totais de Tebuconazol aplicadas sendo menores que as de Piraclostrobina, o perfil de permeação do Tebuconazol através da mucosa vaginal suína demonstrou ser superior e significativamente diferente (ANOVA one way ($p < 0,5$)) ao da Piraclostrobina.

Os modelos *in vitro* desenvolvidos para prever a permeação de substâncias não apenas fornecem informações sobre taxas de absorção e eficácia, no caso de medicamentos, mas também ajudam na investigação e compreensão da patogênese de várias doenças (MACHADO *et al.,* 2015). Verificou-se que a mucosa vaginal suína, utilizada como um modelo de avaliação *in vitro* da permeação de substâncias, é muito semelhante em muitos aspectos à mucosa vaginal humana, ou seja, suas composições lipídicas são comparáveis e esses dois tipos de mucosa também apresentam semelhanças histológicas (VAN EYK e BIJL, 2005). Diante disto, vem

sendo utilizada em estudos *in vitro*, como preditivas da *permeação in vivo*, em humanos (BARBOSA *et al.,* 2021; POLONINI *et al.,* 2015).

Diante dos dados estatísticos disponibilizados pelo IBGE no último censo nacional de 2010, com relação ao percentual de mulheres ocupadas na agricultura no estado de Pernambuco, mais especificamente no município de Belém do São Francisco, onde foi realizada a avaliação *in vivo* presente neste trabalho, é possível verificar que 43,7% das mulheres residentes no município trabalham em atividades de agricultura.

A presença de mulheres trabalhadoras expostas a agrotóxicos no setor agrícola está relacionada a diversos efeitos negativos, entre eles o surgimento de canceres, abortos espontâneos, defeitos congênitos e prematuridade em seus filhos (DHANANJAYAN *et al.,*2019). No mais, já é sabido que a exposição a pesticidas ocasiona aumento do risco de câncer como o câncer de pulmão, ovário, retal, pele, mama, entre outros (GRAAF *et al.,*2022).

5.4.2 Estudo de permeação *in vitro* utilizando mucosa de septo nasal suína

A quantidade de Tebuconazol retida e permeada através da mucosa de septo nasal suíno após finalizado o estudo (4h), bem como o doseamento da quantidade de agrotóxico presente no compartimento doador, estão descritos na tabela 9 e o perfil de permeação deste composto é o demonstrado na figura 39.

Após realização do ensaio de permeação para o agrotóxico Piraclostrobina, foram observados problemas relacionados a detecção. Diante disto, o estudo deve ser repetido e os resultados não foram aqui apresentados.

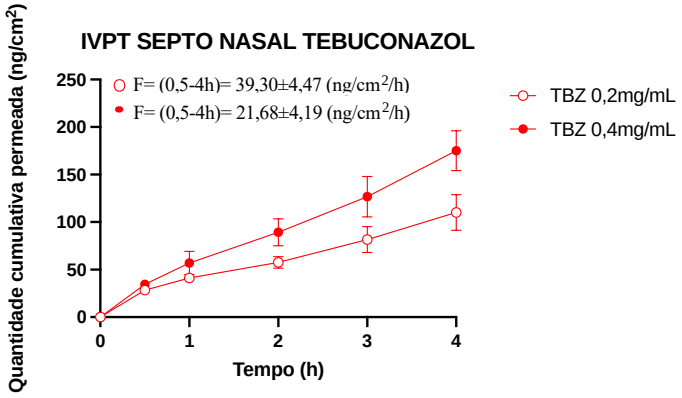
Tabela 11- Quantidade de Tebuconazol encontrada no estudo de permeação através do septo nasal nas concentrações de 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL

Quantidade de Tebuconazol aplicada	**0,2 mg/mL**			**0,4 mg/mL**		
	Média	**DP**	**CV%**	**Média**	**DP**	**CV%**
Retido na mucosa (ng)	511,64	100,75	19,69	672,30	170,99	25,43
Total permeado (ng)	71,54	12,16	17,00	113,80	13,73	12,06

Compartimento doador (ng)	709,86	67,43	9,49	1386,13	134,31	9,69
Quantidade total recuperada (%)	99,46	3,89	3,91	83,54	11,40	13,64

Fonte: Autoria própria.

Figura 39- Perfil cumulativo do Tebuconazol permeado (ng/ cm²) em experimento de 4 horas utilizando mucosa nasal (septo) suína com aplicação de 6,5uL das soluções diluídas dos agrotóxicos, respectivamente (N = 6). F: Fluxo



Fonte: Autoria própria.

A importância principal desta avaliação reside no fato de que na agricultura familiar grande parte dos agricultores envolvidos em alguma das etapas (mistura, carregamento, diluição e aplicação) do agrotóxico não utilizam o devido equipamento de proteção individual preconizado pela legislação vigente (AGGARWAL *et al.,* 2019). Dito isto, os estudos *in vitro*, servem para demonstrar uma problemática real. As semelhanças morfológicas entre a mucosa suína e humana, combinadas com considerações éticas, são as principais razões para utilização desta mucosa em ensaios de permeação (WADELL *et al.,* 2003).

5.4.3 Estudo de permeação *in vitro* utilizando córnea bovina

A quantidade de cada um dos agrotóxicos retida e permeada através da córnea bovina após finalizado o estudo e o doseamento da quantidade de agrotóxico presente no compartimento doador também ao final do estudo, estão descritos nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Quantidade de Tebuconazol encontrada no estudo de permeação nas concentrações de 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL.

Quantidade de Tebuconazol aplicada	**0,2 mg/mL**			**0,4 mg/mL**		
	Média	**DP**	**CV%**	**Média**	**DP**	**CV%**
Retido na córnea (ng)	230,62	12,70	5,50	447,16	69,93	15,63
Total permeado (ng)	17,50	1,25	6,91	24,54	4,43	15,24
Compartimento doador (ng)	574,47	54,82	9,54	1043,65	86,55	8,29
Quantidade total recuperada (%)	63,27	4,30	6,80	58,28	5,96	10,21

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13- Quantidade de Piraclostrobina encontrada no estudo de permeação nas concentrações de 0,3 mg/mL e 0,5 mg/mL.

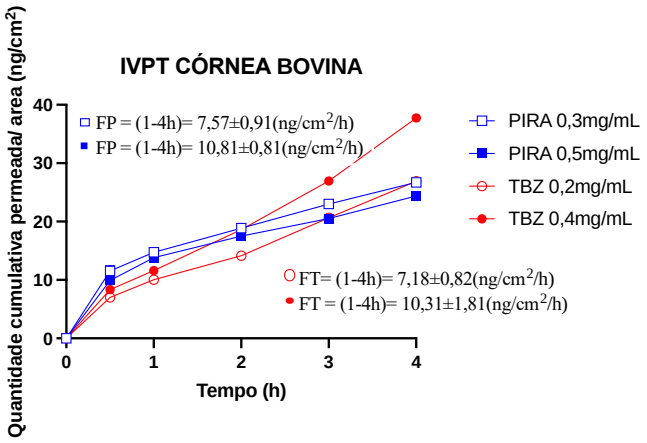
Quantidade de Piraclostrobina aplicada	**0,3 mg/mL**			**0,5 mg/mL**		
	Média	**DP**	**CV%**	**Média**	**DP**	**CV%**
Retido na córnea (ng)	336,33	62,57	18,60	473,91	136,24	28,74
Total permeado (ng)	17,36	0,09	0,55	15,84	0,61	3,89
Compartimento doador (ng)	756,29	85,56	11,31	1023,54	34,44	3,36
Quantidade total recuperada (%)	56,92	1,30	2,28	46,56	4,95	10,63

Fonte: Autoria própria.

No cálculo do balanço de massa, a recuperação tanto do Tebuconazol quanto da Piraclostrobina foi entre 45-65%, demonstrando que houve perdas na execução da metodologia. Estes dados necessitam, portanto, de uma reavaliação.

O perfil de permeação do Tebuconazol e Piraclostrobina obtido a partir da análise dos dados é o demonstrado na figura 40.

Figura 40 - Perfil cumulativo do Tebuconazol e Piraclostrobina permeado (ng/ cm²) em experimento de 4 horas utilizando córnea bovina com aplicação de 6,5uL das soluções diluídas dos agrotóxicos, respectivamente (N = 6). FT: fluxo de tebuconazol. FP: fluxo de piraclostrobina.

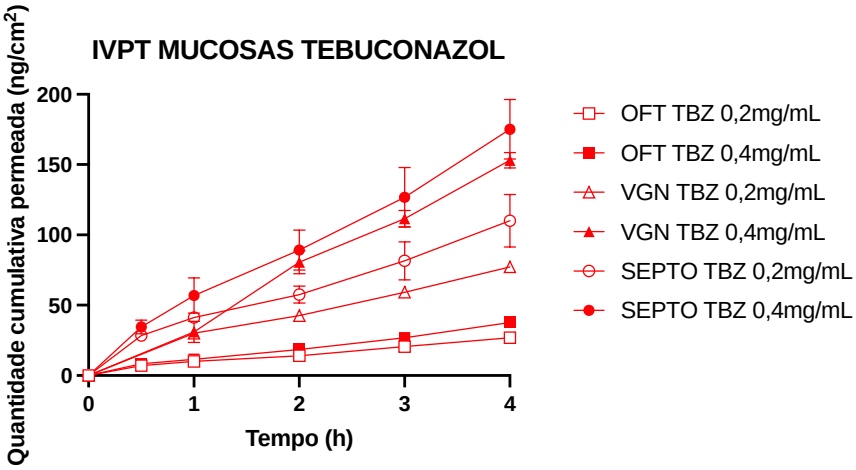


Fonte: Autoria própria.

Seguindo um perfil semelhante a permeação através da mucosa vaginal, na permeação através de córnea bovina, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ANOVA *one way* ($p < 0,5$) na quantidade total permeada, entre as diferentes concentrações do TBZ aplicado. Ao mesmo tempo, a quantidade total permeada de Tebuconazol ANOVA *one way* ($p < 0,5$) foi também maior que a de Piraclostrobina, mesmo após aplicação de concentrações menores.

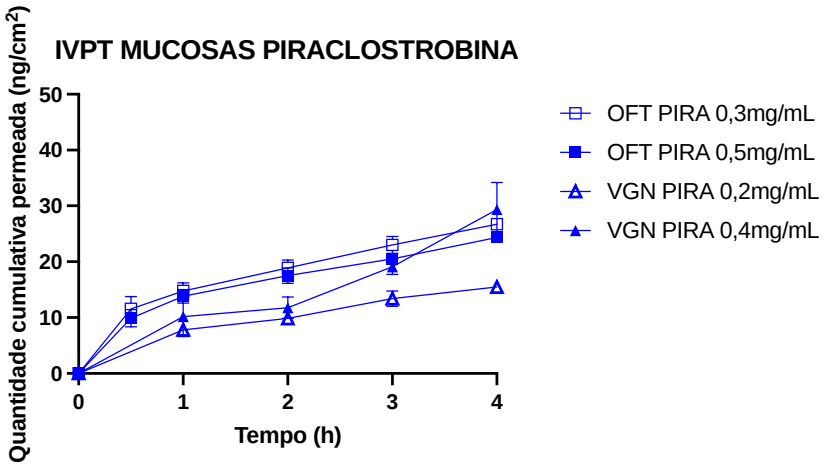
As figuras abaixo 41 e 42 mostram o perfil de permeação do Tebuconazol e Piraclostrobina comparativo, obtido utilizando as diferentes membranas (córnea bovina, mucosa vaginal e septo nasal de suínos) através do mesmo aparato (células de difusão horizontal *side by side*). Os resultados demonstram diferença estatisticamente significativa e maior (ANOVA *one way* $p<0,5$) na quantidade total permeada a partir da aplicação de 0,4mg/mL de Tebuconazol e 0,5mg/mL e Pioraclostrobina através da mucosa vaginal após 4hs de experimento quando comparado com a quantidade total permeada através de outras membranas, independente da concentração do produto aplicada. Foi encontrada uma semelhança estatisticamente significativa (ANOVA *one way* $p<0,5$) na quantidade total de TBZ permeada na aplicação de 0,2mg/mL entre as mucosas vaginal de septo nasal.

Figura 41- Perfil de permeação do Tebuconazol comparativo obtido utilizando as diferentes membranas (córnea bovina, mucosa vaginal e septo nasal de suínos).



Fonte: Autoria própria.

Figura 42- Perfil de permeação da Piraclostrobina comparativo obtido utilizando as diferentes membranas (córnea bovina, mucosa vaginal e septo nasal de suínos).



Fonte: Autoria própria.

5.5 AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO OLHOS INTEIROS

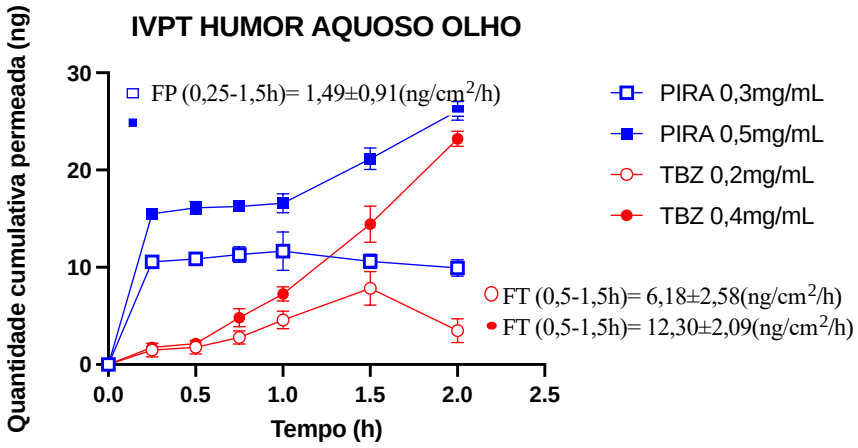
Neste experimento foram propostas algumas modificações ao método desenvolvido por CARDOSO, 2020, que avaliou a permeação do agrotóxico Dimetoato utilizando olhos bovinos

inteiros e frescos, refrigerados e danificados. As principais modificações metodológicas realizadas foram a avaliação em diferentes estruturas internas do olho, com o objetivo de avaliar a biodistribuição dos agrotóxicos nos tecidos; a quantidade aplicada foi diminuída visando tornar mais realista o experimento; antes da aplicação dos produtos, o olho foi umedecido com soro fisiológico, com o objetivo de manter a umidade.

5.5.1 Avaliação da biodistribuição *in vitro* utilizando olhos bovinos inteiros

A figura 43 mostra os resultados obtidos após a análise do perfil de permeação dos agrotóxicos no humor aquoso e a figura 44 a retenção nas estruturas internas do olho (córnea, íris, humor vítreo, coróide e a retina), quando da aplicação de 50µL dos produtos diluídos do Tebuconazol e da Piraclostrobina durante o período de 2h. A retenção foi avaliada nos tempos de contato de 15 minutos e 2h do experimento.

Figura 43- Perfil cumulativo do Tebuconazol e Piraclostrobina permeado (ng/ cm²) no humor aquoso em experimento de 2 horas utilizando olho bovino inteiro, com aplicação de 50 uL das soluções diluídas dos agrotóxicos, respectivamente (N = 6). FT: fluxo de tebuconazol. FP: fluxo de piraclostrobina.



Fonte: Autoria própria.

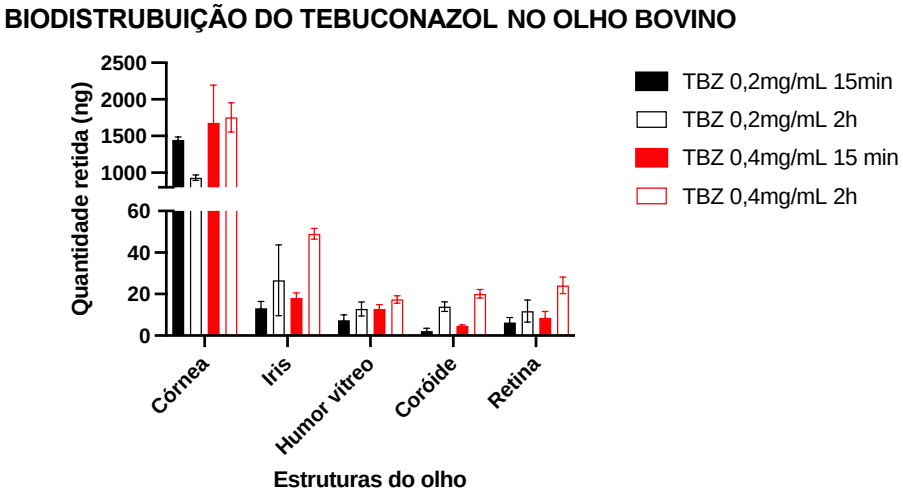
Independente do agrotóxico utilizado, quando da aplicação da diluição de menor concentração, houve uma diminuição da permeação após 1 e 1,5h para a Piraclostrobina e Tebuconazol, respectivamente, provavelmente devido a depleção do agrotóxico sobre a córnea. Contrariamente, quando da aplicação das maiores concentrações dos produtos diluídos, independente do agrotóxico utilizado, houve aumento da quantidade de agrotóxico permeada.

Os estudos realizados por Cardoso, 2020 em olho inteiro, demonstraram resultados estatisticamente semelhantes entre as concentrações de Dimetoato no humor aquoso aos 60 e 120 minutos após aplicação de 50µL de dimetoado 5 mg/mL. Neste estudo, com as menores diluições de Tebuconazol e Piraclostrobina aplicadas, este mesmo padrão foi observado.

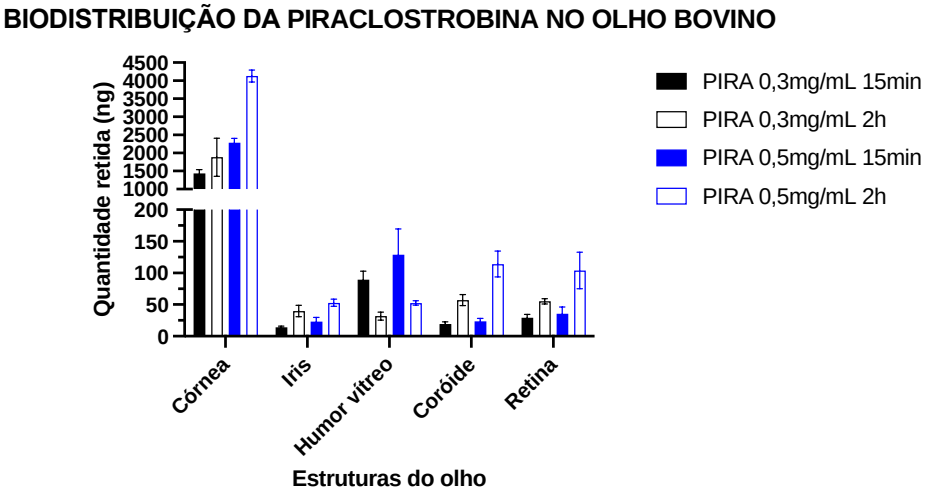
Os dados observados após permeação utilizando o modelo de olho inteiro demonstraram quantidade total permeada de Piraclostrobina maior que de Tebuconazol, contrariando o resultado utilizando córnea bovina excisada em experimento *in vitro* utilizando células de difusão horizontal *side by side.* Uma melhor avaliação deste fato deve ser feita

A figura 44 apresenta uma avaliação comparativa entre as retenções observadas nas diferentes estruturas do olho bovino para as diluições de trabalho de ambos os agrotóxicos avaliados neste trabalho.

Figura 394- Retenção nas estruturas internas do olho (córnea, íris, humor vítreo, coróide e a retina), quando da aplicação de 50µL de Tebuconazol (A) e Piraclostrobina (B), nos tempos de contato de 15 minutos e 2h do experimento.



A



B

Fonte: Autoria própria.

Independente do agrotóxico utilizado, a aplicação de concentrações maiores gerou retenções também maiores em todas as estruturas internas do olho avaliadas. Ao mesmo tempo, a concentração de agrotóxico retida (ng/mL) em todas as estruturas foi maior após duas horas de experimento que nos primeiros 15 minutos (exceto para a concentração recuperada no humor vítreo para a Piraclostrobina).

Estudos de biodistribuição em tecidos oculares foram realizados por Caravaca *et al,*2023 para avaliação da progesterona. Neste caso foi utilizado o olho suíno devido a sua maior similaridade com o olho humano no que trata de tamanho, espessura da córnea (0.5–0.7 mm) e esclera (AGARWAL e RUPENTHAl, 2016). No nosso estudo, como foi utilizado olho bovino (espessura de córnea 0.9–1.1 mm), admite-se uma menor permeação, comparada a permeação através da córnea humana.

5.5.2 Avaliação da biodistribuição *in vitro* utilizando olhos suínos inteiros

A figura 45 mostra os resultados obtidos após a análise do perfil de permeação dos agrotóxicos no humor aquoso suíno durante o período de 2 horas quando da aplicação de 25µL dos produtos diluídos do Tebuconazol e da Piraclostrobina. Já a figura 46 a retenção nas estruturas internas do olho (córnea, esclera, íris, humor vítreo e coróide), quando da aplicação de 25µL dos produtos diluídos do Tebuconazol e da Piraclostrobina durante o período de 2h. A retenção foi avaliada nos tempos de contato de 15 minutos e 2h do experimento.

Figura 405- Perfil cumulativo do Tebuconazol e Piraclostrobina permeado (ng/ cm²) no humor aquoso em experimento de 2 horas utilizando olho suíno inteiro, com aplicação de 25 uL das soluções diluídas dos agrotóxicos, respectivamente (N = 6).

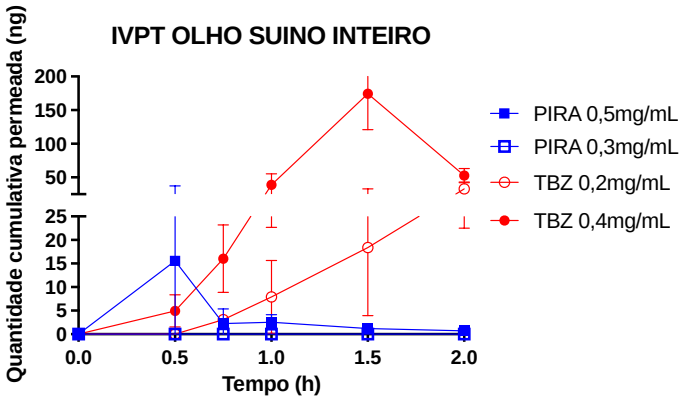
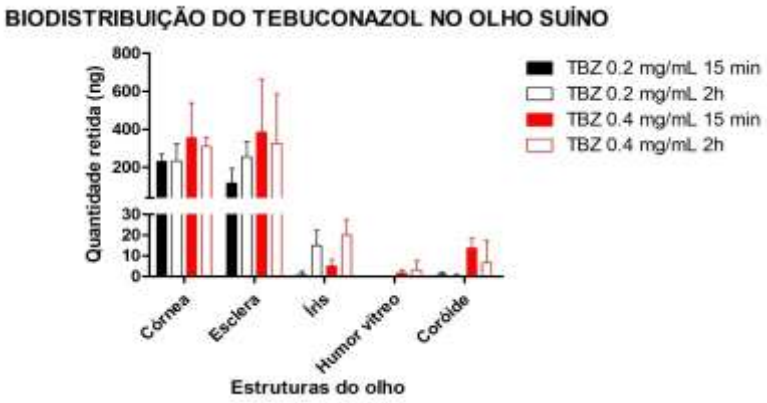
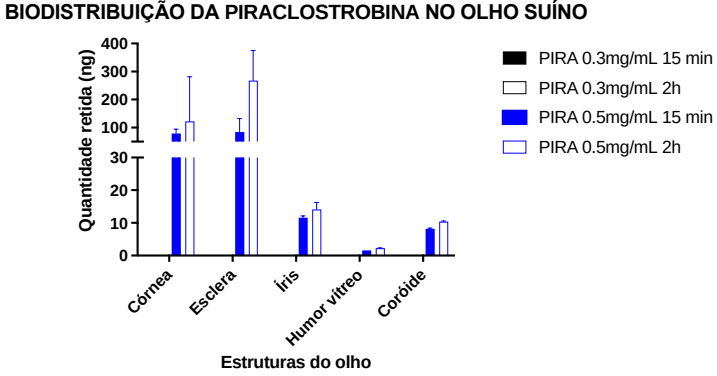


Figura 416- Retenção nas estruturas internas do olho (córnea, esclera, íris, humor vítreo e coroide), quando da aplicação de 25µL de Tebuconazol (A) e Piraclostrobina (B), nos tempos de contato de 15 minutos e 2h do experimento.



A



B

Quando da avaliação da biodistribuição dos agrotóxicos nas estruturas oculares suínas da córnea, esclera, íris, humor vítreo e coroide com 15 minutos e 2 horas de contato com as diluições dos produtos foi possível observar um aumento de retenção do agrotóxico Tebuconazol na íris e no humor vítreo. Para concentração de 0,4 mg/mL o aumento na íris foi de cerca de 4 vezes mais enquanto que para concentração de 0,2 mg/mL esse aumento esteve em torno de 20 vezes. Para o humor vítreo em ambas concentrações avaliadas do Tebuconazol este aumento esteve em torno de 1 vez no tempo de contato de 2 horas em comparação com o tempo de 15 minutos.

Para Piraclostrobina quando da avaliação da diluição de 0,5 mg/mL foi observado um aumento na concentração de agrotóxico encontrada em todas as estruturas oculares, quando comparado o tempo de 15 minutos e 2 horas de contato. Para as estruturas da córnea, íris, humor vítreo e coroide esse aumento foi de cerca de 1,5 vezes, já para esclera o aumento esteve em torno de 3 vezes mais. Na avaliação da diluição a 0,3 mg/mL não foi possível inferir comparações entre os tempos de contato propostos, visto que as concentrações doseadas se encontraram abaixo do limite de detecção do método analítico, não sendo possível realizar essa diferenciação.

Da mesma forma como foi observado na avaliação da biodistribuição com olho bovino a concentração de agrotóxico retida (ng/mL) em todas as estruturas foi maior após duas horas de experimento que nos primeiros 15 minutos

5.6 TESTE DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE EM CÓRNEA BOVINA (BCOP)

De acordo com a metodologia utilizada, o BCOP classifica as formulações como: categoria 1, no caso de causarem danos graves as córneas; sem categoria, aquelas classificadas como não irritantes para as córneas e as formulações não determinadas, quando não é possível realizar uma predição. A tabela 14 a seguir apresenta os resultados obtidos.

Tabela 14- Resultados obtidos com a realização do teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina.

Substância avaliada	**Pontuação**		**Classificação**
	M	**DP**	
Tebuconazol 0,2 mg/mL	2,09	2,29	Sem categoria
Tebuconazol 0,4 mg/mL	2,43	1,01	Sem categoria

Tebuconazol 200 g/L	5,25	4,23	Sem predição
Piraclostrobina 0,3 mg/mL	2,79	0,96	Sem categoria
Piraclostrobina 0,5 mg/mL	2,98	0,85	Sem categoria
Piraclostrobina 250 g/L	8,93	3,85	Sem predição
NaOH 1%	190,44	3,31	Categoria 1
NaCl 0,9%	2,02	0,60	Sem categoria

Fonte: Autoria própria.

As soluções controle apresentaram resultado esperado, sendo a solução de NaOH 0,1N, classificada como categoria 1, capaz de causar danos graves à córnea, e a solução fisiológica de NaCl a 0,9% incapaz de causar irritação. Já com relação aos agrotóxicos avaliados o perfil para ambos foi semelhante. Os produtos diluídos foram classificados como sem categoria, ou seja, não sendo capaz de causar graves danos à córnea. Já os produtos concentrados foram classificados como não determinados, onde nenhuma predição pode ser feita com relação ao potencial de irritação oftálmica desses produtos.

É essencial que sejam realizadas avaliações acerca do potencial de irritabilidade ocular de agrotóxicos que não tem seus efeitos irritantes de contato percebidos visualmente pelos trabalhadores, que continuam a lidar com os agrotóxicos, na maioria das vezes, sem proteção ou com proteção limitada (SHALINI, PROSUN, SUJATA, 2016)

5.7 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE RESÍDUOS DE TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA EM AGRICULTORES

O ensaio *in vivo* foi realizado em plantação de cebola, onde, geralmente, todas as atividades exceto a aplicação de agrotóxicos, são realizadas na posição de cócoras. Os trabalhadores envolvidos nestas atividades na agricultura familiar, incluindo as mulheres, são responsáveis pela aquisição e uso do vestuário de proteção individual, cabendo a ele julgar se é adequado para o manuseio e aplicação do agrotóxico. No caso de mulheres, o uso de saia, as deixa mais expostas ao contato com os agrotóxicos, como demonstrado das figuras 47 a 49.

Figura 427- Agricultora com suas vestimentas de trabalho.

Fonte: https://share.america.gov/pt-br/com-bilhoes-de-pessoas-para-serem-alimentadas-agricultura-sustentavel-nao-e-um-luxo/

Figura 438- Mulheres na agricultura.

Fonte:https://outraspalavras.net/outrasaude/se-nao-reconhece-o-papel-e-o-trabalho-das-mulheres-entao-nao-e-agroecologia/

Figura 449- Mãe e filha na agricultura.

Fonte: https://believe.earth/pt-br/empoderar-mulheres-rurais-e-dar-poder-ao-meio-ambiente/

As decisões sobre o uso de EPIs representam um desafio, pois muitos trabalhadores agrícolas desconhecem os perigos potenciais dos produtos agrotóxicos e muitas vezes não estão informados sobre o tipo de EPI que deve ser usado durante o manuseio desses produtos (DAMALAS *et al.*, 2016).

O uso de dispositivos de proteção individual depende muito de decisões individuais e essas decisões podem ser influenciadas por vários fatores: percepção do risco, consciência de pertencer a um grupo de risco, consciência da gravidade dos perigos potenciais, crença de que a prevenção é eficaz na redução do risco potencial e também que a prevenção é possível (DAMALAS E HASHEMI, 2010).

A tabela 15 mostra as vestimentas utilizadas por cada um dos trabalhadores avaliados neste ensaio *in vivo.* O aplicador geralmente é o responsável pela aquisição e uso do vestuário de proteção individual, cabendo a ele julgar se ele é adequado para o manuseio e aplicação do agrotóxico. Com exceção do pesquisador, nenhum dos trabalhadores participantes do estudo usava vestimenta adequada.

Tabela 15- Vestimentas utilizadas pelos trabalhadores rurais avaliados neste estudo *in vivo*.

Trabalhadores rurais avaliados	Vestimentas utilizadas
Pesquisador	Vestuário normal de trabalho (casacos de manga comprida e calças de algodão e tênis) (> 300 g/m^2) (FMC Química do Brasil Ltda, n.d.).
Trabalhador 1 (T1)	Blusa de algodão de mangas compridas, calça comprida de tactel, botas de cano curto, máscara PFF2 e chapéu.
Trabalhador 2 (T2)	Blusa de algodão de mangas compridas, bermuda de tactel, botas de cano longo, máscara PFF2 e boné.
Trabalhador 3 (T3)	Blusa de algodão de mangas compridas, calça jeans e botas de cano longo.
Trabalhador 4 (T4)	Blusa de mangas compridas com proteção UV, calça comprida de tactel, botas de cano longo e boné.
Trabalhador 5 (T5)	Blusa de mangas compridas com proteção UV, bermuda jeans, chinelos e boné.

Fonte: Autoria própria.

A figura 50 corresponde a fotografias registradas durante os dias de realização da avaliação *in vivo* deste trabalho, no município de Belém do São Francisco-Pernambuco.

Figura 50- Trabalhadores rurais realizando suas atividades rotineiras durante a avaliação *in vivo*.

Fonte: Acervo pessoal

Da mesma forma que foi evidenciado na pesquisa de Cardoso *et al.*, 2020, os trabalhadores avaliados neste trabalho demonstraram preocupação com a exposição ao sol, visto que em sua maioria utilizaram bonés e blusas de manga comprida, sejam com proteção UV ou não. No entanto, não demonstraram a mesma preocupação com relação a exposição aos agrotóxicos manipulados por eles, como visto na figura 48 acima. Segundo Licina *et al.* 2019, "têxteis comuns oferecem alguma proteção, mas permanecem inferiores aos equipamentos de proteção individual corretos, resultando em toxicidades agudas e crônicas após a penetração

percutânea de pesticidas da roupa". Isso significa que a absorção e permeabilidade dos têxteis pode ser influenciado pela forma como os agrotóxicos se distribuem dentro do próprio tecido.

O acima mencionado é particularmente importante, porque de acordo com Garrigou *et al.* 2020, se essas roupas forem usadas tanto para manusear agrotóxicos quanto como roupas comuns, elas poderiam ser usadas como tal para tarefas agrícolas que não sejam o manuseio de agrotóxicos, durante todo o dia. Ao mesmo tempo, as condições ambientais, como calor, umidade e transpiração do trabalhador, também podem afetar a transferência de agrotóxicos da roupa para a pele (WESTER *et al.*, 2000).

Em estudo de IVPT realizado por Carvalho, 2022 (dados não publicados), utilizando tecido jeans e UV (úmidos ou secos) acima da pele humana, mostrou que a quantidade cumulativa permeada (μg/cm^2) do agrotóxico Dimetoato utilizando os tecidos umedecidos com suor artificial foram significativamente diferentes entre o uso do tecido UV e jeans úmidos após as 6hs, sendo maior com o uso do jeans. Ao mesmo tempo, não foi observada diferença estatisticamente significativa após 10hs de permeação, entre o uso do jeans úmido e da pele sozinha (ANOVA post-hoc Bonferroni test, $p<0.05$). De acordo com o autor, isto pode demonstrar a inexistência de qualquer nível de proteção da pele com o uso do tecido jeans, após um determinado tempo de contato com pele "suada" (~10hs). Um estudo de IVPT realizado por Cardoso (2020) utilizando pele de porco, *cotton* seco, uma aplicação de 0,4 e 1,8ug de Dimetoato, e um tempo de contato de 4 horas, demonstrou que a concentração do agrotóxico retido na pele foi 3 à 6x maior quando da aplicação do spray diretamente sobre a pele.

Todas as descrições acima relatadas, demonstram a necessidade de ações direcionadas a educação e treinamento do trabalhador rural quanto ao uso do agrotóxico (MEMON *et al.,* 2019) Visto que o treinamento dos agricultores sobre o uso de produtos agrotóxicos foi associado a altos níveis de comportamento de segurança (DAMALAS e KOUTROUBAS, 2017).

A Tabela 16, abaixo, mostra as quantidades de Tebuconazol (ng/cm^2) extraídas dos algodões (*patchs*) avaliados.

Tabela 16- Quantidade de Tebuconazol (ng/cm2) encontrada no algodão avaliado em diferentes regiões do corpo em cinco trabalhadores e um pesquisador, após 4 horas de trabalho rotineiro.

Região do corpo	**Tebuconazol em algodão (ng/cm²)**				
	Pesquisador	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**

Centro do peito	69,59	1,243	2,522	473,765	104,332	113,838
Antebraço direito	2,75	2,907	139,173	3,090	17,710	17,040
Antebraço esquerdo	5,21	5,487	20,350	2,892	10,166	6,539
Coxa direita	6,53	6,474	19,209	22,640	56,124	93,759
Coxa esquerda	2,37	0,737	18,940	21,162	13,264	95,818
Pé direito	62,00	6.576,03	5.669,314	685,158	11,989	348,121
Pé esquerdo	37,06	13.052,68	4.621,085	408,482	39,349	408,554
Nuca	0,46	2,380	2,309	0,485	2,870	63,580

Fonte: Autoria própria.

As Tabelas 17, 18 e 19 apresentam as quantidades de Tebuconazol extraídas das fitas adesivas contendo estrato córneo (ng/cm^2), o valor de exposição dérmica calculado e o fator de penetração (FP) no estrato córneo respectivamente, para os 5 trabalhadores rurais participantes do estudo mais um pesquisador. A Tabela 20 mostra a exposição e percentual de dose tóxica por hora de trabalhadores ao Tebuconazol durante a realização de pulverização de cebola.

Tabela 17- Quantidade de Tebuconazol (ng/cm2) encontrada em fita com estrato córneo avaliada em diferentes regiões do corpo em todos os participantes e o pesquisador, após 4 horas de trabalho.

Região do corpo	**Tebuconazol no Estrato Córneo (ng/cm²)**					
	Pesquisador	T1	T2	T3	T4	T5
Antebraço direito	0,00	2,2	24,84	8,00	21,92	22,63
Antebraço esquerdo	0,00	4,63	3,04	5,21	22,93	2,97
Média dos antebraços	0,00	3,41	13,94	6,60	22,42	12,80
Nuca	0,00	1,66	12,80	1,93	1.030,51	5,67

Fonte: Autoria própria.

Tabela 18- Valor de exposição dérmica de Tebuconazol (mg/região do corpo).

Valor de exposição dérmica (mg de Tebuconazol/ região do corpo)					
Pesquisador	T1	T2	T3	T4	T5
0,42	25,76	138,28	3,29	0,73	2,16

Fonte: Autoria própria.

Tabela 19- Fator de penetração do Tebuconazol (FP%) no estrato córneo analisado para todos os participantes.

Região do corpo	**Fator de penetração do Tebuconazol (FP%) no estrato córneo**					
	Pesquisador	T1	T2	T3	T4	T5
Antebraços	0,00	44,84	14,88	68,83	61,67	52,06
Nuca	0,00	0,85	84,72	79,94	99,72	8,18

Fonte: Autoria própria

Tabela 20- Exposição e percentual de dose tóxica por hora de trabalhadores ao Tebuconazol durante a realização de pulverização de cebola.

Participantes do estudo	**Dermal (mg/h)**	**Respiratória (mg/h)**	**Total (percentual de dose tóxica/hora) ***
Pesquisador	0,11	NA	0,00015
T1	6,44	NA	0,0092
T2	34,57	NA	0,0494
T3	0,82	NA	0,0012
T4	0,18	NA	0,0003
T5	0,54	NA	0,0008

Fonte: Autoria própria.

* Calculado para corpo de 70 kg com base na DL50 dérmica para rato (OMS, 1982) e usando a DL50 apresentada na bula do Rival®. NE – Não avaliado neste estudo.NA- não avaliada neste estudo.

Do mesmo modo que o descrito acima, realizado para o Tebuconazol, foram realizadas quantificações para o agrotóxico Piraclostrobina. A Tabela 21 mostra as quantidades de Piraclostrobina (ng/cm^2) extraídas dos algodões (*patchs*) avaliados, enquanto a Tabela 22 apresenta as quantidades de Piraclostrobina extraídas das fitas adesivas contendo estrato córneo (ng/cm^2).

Tabela 21- Quantidade de Piraclostrobina (ng/cm2) encontrada no algodão avaliado em diferentes regiões do corpo em cinco trabalhadores e um pesquisador, após 4 horas de trabalho rotineiro.

Região do corpo	**Piraclostrobina em algodão (ng/cm²)**					
	Pesquisador	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
Centro do peito	69,59	0,957	3,243	36,838	120,084	22,269
Antebraço direito	2,75	3,000	345,441	0,861	59,128	33,518
Antebraço esquerdo	5,21	0,845	50,386	21,899	50,487	16,342
Coxa direita	6,53	7,647	39,388	81,746	67,497	109,750
Coxa esquerda	2,37	2,503	39,886	57,001	15,988	12,577
Pé direito	62,00	5.152,124	5.606,293	670,312	3,975	662,652
Pé esquerdo	37,06	9.541,949	4.889,634	1.394,802	0,449	501,567
Nuca	0,46	1,520	2,404	0,935	23,905	40,591

Fonte: Autoria própria.

Tabela 22- Quantidade de Piraclostrobina (ng/cm2) encontrada em fita de estrato córneo avaliada em diferentes regiões do corpo em todos os participantes e o pesquisador, após 4 horas de trabalho.

Região do corpo	**Piraclostrobina no Estrato Córneo (ng/cm²)**					
	Pesquisador	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
Antebraço direito	0,00	3,45	59,089	39,83	66,86	33,47

Antebraço esquerdo	0,00	4,07	4,095	17,94	43,81	9,25
Média dos antebraços	0,00	3,76	61,14	28,88	55,33	21,36
Nuca	0,00	1,73	17,88	14,12	7,98	4,51

Fonte: Autoria própria.

Os valores calculados de exposição dérmica calculado e o fator de penetração (FP) no estrato córneo estão descritos nas Tabela 23 e 24 respectivamente, para o pesquisador e 5 trabalhadores rurais participantes do estudo.

Tabela 23- Valor de exposição dérmica de Piraclostrobina (mg/região do corpo).

Valor de exposição dérmica (mg de piraclostrobina/região do corpo)					
Pesquisador	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
0,42	19,30	145,43	3,39	0,89	2,14

Fonte: Autoria própria.

Tabela 24- Fator de penetração do Piraclostrobina (FP%) no estrato córneo analisado para todos os participantes.

Região do corpo	**Fator de penetração da piraclostrobina (FP%) no estrato córneo**					
	Pesquisador	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
Antebraços	0,00	66,16	23,60	71,74	50,24	46,14
Nuca	0,00	53,27	88,15	93,79	25,02	9,99

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 25 mostra a exposição e percentual de dose tóxica por hora de trabalhadores a Piraclostrobina durante a realização de pulverização de cebola.

Tabela 25- Exposição e percentual de dose tóxica por hora de trabalhadores a Piraclostrobina durante a realização de pulverização de cebola.

Participantes do estudo	**Dermal (mg/h)**	**Respiratória (mg/h)**	**Total (percentual de dose tóxica/hora)**
Pesquisador	0,11	NA	0,00015

T1	4,82	NA	0,0069
T2	36,36	NA	0,0519
T3	0,85	NA	0,0012
T4	0,22	NA	0,0003
T5	0,53	NA	0,0007

Fonte: Autoria própria

NA- não avaliada neste estudo.

Os fatores de penetração da Piraclostrobina para nuca e braços variaram entre 9,99 - 93,79 e 23,60 -71,74 % e os do Tebuconazol entre 0,85-99,72 e 14,88-68,83%, respectivamente. Estes valores são aparentemente maiores que os encontrados por Cardoso, 2020 e os resultados publicados por Protano, 2009 para o Dimetoato. Esta variação justifica-se devido ao uso equipamentos de proteção individual pelos trabalhadores que não atendiam a todos os requisitos de segurança.

Neste estudo, a piraclostrobina e tebuconazol foram doseados nas secreções dos olhos, mediante análise direta (Tabela 26), com o objetivo de mostrar aos agricultores que a falta de óculos de proteção podem aumentar a possibilidade de exposição da via ocular. Somado a isto, durante a aplicação do agrotóxico, o manuseio da bomba, e posterior uso das mãos sem lavagem, podem tem influenciado nesta contaminação. No entanto, não podemos descartar que a contaminação pode levar a resultados perigosos, e a longo prazo até trazer prejuízos a saúde desses trabalhadores, uma vez que os agrotóxicos são conhecidos por causar anormalidades nos olhos associadas a visão turva, lacrimejamento, dor nos olhos, vermelhidão, inchaço e irritação dos olhos, após a exposição a agrotóxicos, e geralmente esses prejuízos são maiores entre os trabalhadores de pulverização (SANYAL, 2017). Apesar de não ter sido analisada, a exposição respiratória é particularmente perigosa porque as partículas de pesticidas podem ser rapidamente absorvidas através dos pulmões para a corrente sanguínea, podendo causar sérios danos ao nariz e tecido pulmonar se inalado em quantidades suficientes (RISK, 2001).

Tabela 26- Resultados análise da Piraclostrobina e Tebuconazol na lágrima dos trabalhadores (ng/ mL).

Amostra	**Concentração de Piraclostrobina e Tebuconazol (ng/mL)**					
	Pesquisador	T1	T2	T3	T4	T5
Piraclostrobina	0,00	455,307	0,695	23,88/	14,542/	14,505/

olho direito						
Piraclostrobina olho esquerdo	0,00	42,02	14,93	<LIQ*	3,43	2,82
Tebuconazol olho direito	0,00	2,278	1,979	13,729	8,36	9,621
Tebuconazol olho esquerdo	0,00	1,05	2,50	<LIQ*	2,23	2,83

Fonte: Autoria própria

<LIQ* (Limite inferior de quantificação 9,99 ng/ mL)

De acordo com Thredgold et al. (2019), em ambientes agrícolas, apesar da aplicação por pulverização ser comum, é relatado que apenas 10% da exposição total a agrotóxicos ocorre por via respiratória. Os 90% restantes são atribuídos à absorção ou ingestão dérmica. Neste estudo não foi avaliada a exposição respiratória. Por esse motivo, para o cálculo do percentual de dose tóxica (Tabelas 20 e 25), esse dado foi desconsiderado.

Fazer um experimento controlado em uma plantação real, com aplicadores reais em condições reais de trabalho é muito difícil. Isso se deve ao fato de que há vários fatores envolvidos no momento e condições de aplicação de produtos agrotóxicos, bem como ao grande número de produtos utilizados (MERCADANTE *et al.,* 2018). Somado a isto, os trabalhadores podem ser expostos via dérmica, ao produto, por exemplo, durante a mistura e carregamento, ou à diluição do spray durante a aplicação no campo, ou seja, em atividades que precedem a aplicação propriamente dita (AGGARWAL *et al.,* 2019), o que, dificulta mais ainda o controle do experimento.

Neste estudo, padronizou-se a área e o tipo de plantio, o produto e seu preparo, bem como o tempo de pulverização, utilizando-se bombas costais de mesmo volume. O método *patch* utilizado neste estudo assume que a distribuição dos agrotóxicos ocorre de maneira uniforme na superfície do corpo, o que é uma desvantagem do método, mas apesar disso tem sido utilizado por vários pesquisadores por ser de baixo custo (SOUTAR *et al.*, 2000; POUZOU *et al.,* 2018).

Os dados sobre a exposição dérmica na atividade de aplicação de produtos agrotóxicos por pulverização são escassos na literatura. Além disso, não é muito claro em trabalhos se as medições da exposição dérmica estão relacionadas apenas ao processo de pulverização ou ao manuseio do produto agrotóxico como um todo (ou seja, incluindo a preparação do caldo de pulverização) (BERGER-PREIß *et al.,*2005).

Nas estimativas de casos de câncer para o ano de 2023 disponibilizadas pelo INCA, descritas no referencial teórico deste trabalho, que cerca de 15% dos casos de câncer no estado de Pernambuco são relativos a neoplasias que atingem a população feminina. Através do levantamento de dados da Secretaria de Saúde de Belém do São Francisco, foram notificados 184 óbitos por neoplasias no período de 2010 a 2020, sendo 51,09% destes obtidos referentes ao sexo feminino (CARVALHO, 2022).

Correlacionando as informações obtidas na literatura com uma expressiva parcela da população feminina ligada as atividades de agricultura no município de Belém do São Francisco, uma significante incidência de casos de canceres femininos no estado de Pernambuco e de óbitos no município de Belém do São Francisco é possível levantar alguns questionamentos acerca da relação de exposição a produtos agroquímicos *versus* o desenvolvimento de neoplasias.

Contudo na avaliação *in vivo* realizada neste trabalho, não houve nenhuma trabalhadora agrícola participante do sexo feminino, sendo importante a avaliação destas mulheres em trabalhos futuros para que se possa obter maiores informações sobre o potencial de permeação cutânea e transmucosa dos agrotóxicos a que essas mulheres se encontram expostas ao realizar suas atividades de trabalho nas lavouras.

6 CONCLUSÃO

- O método bioanalítico adaptado por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) para detecção de resíduos de Tebuconazol e Piraclostrobina em pele humana, fitas adesivas contendo estrato córneo, secções de algodão, mucosa vaginal e septo nasal suínos, córnea e demais estruturas oculares bovinas mostrou-se seletivo e linear, sendo então confiável para realização das análises quantitativas deste trabalho;
- Os ensaios de permeação *in vitro,* em sistema de difusão vertical, utilizando pele humana evidenciaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,5$) na quantidade total permeada entre os agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina. O perfil de permeação do Tebuconazol através da pele humana demonstrou ser superior ao da Piraclostrobina. O balanço de massas entre 95-105%, demonstra reprodutibilidade na execução da metodologia;
- Os resultados dos ensaios *in vitro,* em sistema de difusão horizontal, utilizando mucosas vaginal e de septo nasal suínos e de córnea bovina apresentaram semelhantes aos encontrados para pele humana. Tanto nas mucosas suínas quanto na córnea bovina o percentual de Tebuconazol permeado foi maior que o de Piraclostrobina ($p < 0,5$), mesmo as quantidades de Tebuconazol aplicadas serem menores quando em comparação com as quantidades aplicadas de Piraclostrobina. O balanço de massas para os ensaios com mucosas suínas apresentou reprodutibilidade adequada, entre 95 e 105%, já para córnea bovina este valor ficou em torno de 45 a 65%, o que demonstra uma perda considerável, sendo necessárias mais avaliações da permeação através desta biomembrana;
- Na avaliação da biodistribuição em olhos bovinos inteiros foi observado para ambos os agrotóxicos um aumento da quantidade permeada a partir das diluições mais concentradas, para Piraclostrobina 0,5mg/mL e para o Tebuconazol 0,4mg/mL. Além disso os dados demonstraram quantidade total de permeada de Piraclostrobina maior que de Tebuconazol, diferentemente do resultado que foi obtido na permeação em córnea bovina *in vitro* utilizando células de difusão horizontal *side by side.* Esse resultado mostra necessária uma reavaliação dos parâmetros envolvidos em ambos os testes.
- Na avaliação da biodistribuição em olhos suínos inteiros pôde-se observar, da mesma forma que para a avaliação com olhos bovinos, que as diluições mais concentradas de ambos os produtos (Piraclostrobina 0,5mg/mL e Tebuconazol 0,4mg/mL) geraram um aumento de quantidade permeada. Além disso foi observado um aumento da concentração retida tanto do Tebuconazol quanto da Piraclostrobina com um maior tempo de contato de suas diluições na superfície ocular.

- Ainda com relação a avaliação da biodistribuição dos produtos analisados foram evidenciadas que aplicação de maiores concentrações de ambos os agrotóxicos geraram maiores retenções em todas as estruturas internas do olho avaliadas. Sendo essas maiores concentrações observadas após duas horas de experimento quando comparadas com 15minutos de experimento.
- Na avaliação *in vivo* foi observada a falta de uso de EPI's e a pequena preocupação dos trabalhadores rurais com os perigos de estarem expostos sem a proteção adequadas a produtos agrotóxicos, evidenciando a necessidade de ações de educação e treinamento do trabalhador rural quanto ao uso do agrotóxico. No que que diz respeito ao fator de penetração calculado e a quantidade de agrotóxicos encontrada nas lagrimas dos trabalhadores observa-se uma variação deste percentual entre os participantes da avaliação, muito associada ao não uso de vestimentas e calçados adequados, luvas e óculos de proteção.

REFERÊNCIAS

ABD, Eman; YOUSUF, Shereen; PASTORE, Michael; TELAPROLU, Krishna; MOHAMMED, Yousuf; NAMJOSHI, Sarika; GRICE, Jeffrey; ROBERTS, Michael. Skin models for the testing of transdermal drugs. **Clinical Pharmacology**: Advances and Applications, [S.L.], v. 8, p. 163-176, out. 2016.

ACHARYA, Jyotsna; BAKKER, Matthew G.; MOORMAN, Thomas B.; KASPAR, Thomas C.; LENSSEN, Andrew W.; ROBERTSON, Alison E.. Effects of fungicide seed treatments and a winter cereal rye cover crop in no till on the seedling disease complex in corn. **Canadian Journal Of Plant Pathology**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 481-497, 7 set. 2018.

ADESUYI, A.A; NJOKU, K.L; OGUNYEBI, A.L; DADA, E.O; ADEDOKUN, A.H; JOLAOSO, A.O; AKINOLA, M.O. Evaluation of the Cytogenotoxic Effects of Emulsifiable Concentrate form of Amitraz Pesticide on Allium cepa L. **Journal Of Applied Sciences And Environmental Management**, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 1841, 3 jan. 2019.

ADRIAENS, E. et al. Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. **Archives of toxicology,** v. 88, n. 3, p. 701-723, 2014.

AGGARWAL, M.; BATTALORA, M.; FISHER, P.; HÜSER, A.; PARR-DOBRZANSKI, R.; SOUFI, M.; MOSTERT, V.; STRUPP, C.; WHALLEY, P.; WIEMANN, C.. Assessment of in vitro human dermal absorption studies on pesticides to determine default values, opportunities for read-across and influence of dilution on absorption. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 412-423, abr. 2014.

AGGARWAL, M.; FISHER, P.; HÜSER, A.; KLUXEN, F.M.; PARR-DOBRZANSKI, R.; SOUFI, M.; STRUPP, C.; WIEMANN, C.; BILLINGTON, R.. Assessment of an extended dataset of in vitro human dermal absorption studies on pesticides to determine default values, opportunities for read-across and influence of dilution on absorption. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 72, n. 1, p. 58-70, jun. 2015.

AGGARWAL, M.; FISHER, P.; KLUXEN, F.M.; MAAS, W.; MORGAN, N.; PARR-DOBRZANSKI, R.; STRUPP, C.; WIEMANN, C.. Assessing in vitro dermal absorption of dry residues of agrochemical sprays using human skin within OECD TG 428. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 106, p. 55-67, ago. 2019.

AGRAHARI, Vibhuti; MANDAL, Abhirup; AGRAHARI, Vivek; TRINH, Hoang M.; JOSEPH, Mary; RAY, Animikh; HADJI, Hicheme; MITRA, Ranjana; PAL, Dhananjay; MITRA, Ashim K.. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. **Drug Delivery And Translational Research**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 735-754, 31 out. 2016.

AHEMAD, Munees; KHAN, Mohammad Saghir. Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth-promoting Bradyrhizobium sp. MRM6 strain. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 1, p. 245-254, 3 ago. 2012.

ALAMBIAGA-CARAVACA, Adrián M.; IGLESIAS, Laura G. González; RODILLA, Vicent; KALIA, Yogeshvar N.; LÓPEZ-CASTELLANO, Alicia. Biodistribution of progesterone in the eye after topical ocular administration via drops or inserts. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 630, p. 122453, jan. 2023.

ALQAWLAQ, Samih; SIVAK, Jeremy M.; HUZIL, J. Torin; IVANOVA, Marina V.; FLANAGAN, John G.; BEAZELY, Michael A.; FOLDVARI, Marianna. Preclinical development and ocular biodistribution of gemini-DNA nanoparticles after intravitreal and topical administration: towards non-invasive glaucoma gene therapy. **Nanomedicine**: Nanotechnology, Biology and Medicine, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1637-1647, nov. 2014.

ANDRADE, Ana Rosa Brissant de; CARVALHO, Deoclécio Lustosa de; KISHISHITA, Juliana; PIMENTA, Camila de Almeida Perez; SOUZA, Asley Thalia Medeiros; SANTANA, Davi Pereira de; LEAL, Leila Bastos. Dimethoate absorption: a complementary in vitro and *in vivo* assessment. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 95, p. 103961, out. 2022.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/novo-marco-regulatorio. Acessado em: 18 de janeiro de 2023.

ARAÚJO, T. P. **Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK).** 2016. 98p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

ATMACA, Nurgul; ARIKAN, Sevket; ESSIZ, Dinc; KALENDER, Hakan; SIMSEK, Ozkan; BILMEN, Fatih Sultan; KABAKCI, Ruhi. Effects of mancozeb, metalaxyl and tebuconazole on steroid production by bovine luteal cells in vitro. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 59, p. 114-118, abr. 2018.

BAćMAGA, Małgorzata; WYSZKOWSKA, Jadwiga; KUCHARSKI, jan. Bacterial diversity and enzymatic activity in a soil recently treated with tebuconazole. **Ecological Indicators**, v. 123, p. 107373, abr. 2021.

BAGHERI, Asghar; EMAMI, Naier; ALLAHYARI, Mohammad Sadegh; DAMALAS, Christos A.. Pesticide handling practices, health risks, and determinants of safety behavior among Iranian apple farmers. **Human And Ecological Risk Assessment**: An International Journal, [S.L.], v. 24, n. 8, p. 2209-2223, 14 mar. 2018.

BARBOSA, Irla Carla de França; KISHISHITA, Juliana; SILVA, José Wellithom Viturino da; SOUZA, Asley Thalia Medeiros de; VIEIRA, Jeymesson Raphael Cardoso; BEDOR, Danilo César Galindo; SANTANA, Davi Pereira de; LEAL, Leila Bastos. Quality evaluation of a Brazilian marketed herbal medicine made from Schinus terebinthifolius Raddi: changes in the legislation for registration throughout 20 years / avaliação da qualidade de um medicamento à base schinus terebinthifolius raddi (aroeira) comercializado no brasil. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 97631-97643, 18 out. 2021.

BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 27, p. 4671-4677, 2012.

BATISTA, Anderson; SCOLFORO, Paula Gomides Vitor; SCOLFORO, Henrique Ferraço; MELLO, José Marcio de; GUEDES, Marcelino; SCOLFORO, José Roberto Soares. Modeling Tree Diameter Growth of Bertholletia excelsa Bonpl. in the Brazilian Amazon. **Forests**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1309, 8 dez. 2020.

BELLOT, Pauline; BRISCHOUX, François; FRITSCH, Clémentine; GOUTTE, Aurélie; ALLIOT, Fabrice; ROCCHI, Steffi; ANGELIER, Frédéric. Evidence of environmental transfer of tebuconazole to the eggs in the house sparrow (Passer domesticus): an experimental study. **Chemosphere**, v. 308, p. 136469, dez. 2022.

BENAVIDES, Estefania; MANJARRES, Sara; SALAMANCA, Constain H.; BARRERA-OCAMPO, Alvaro. Rabbit Ear Membranes as an Interesting Alternative for Permeability Tests in the Preformulation Stages of Cosmetic Products. **Cosmetics**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 35, 18 maio 2020.

BERCHIN, Issa Ibrahim; NUNES, Nei Antonio; AMORIM, Wellyngton Silva de; ZIMMER, Gabriel Alfredo Alves; SILVA, Franciani Rodrigues da; FORNASARI, Vitória Haendchen; SIMA, Mihaela; GUERRA, José Baltazar Salgueirinho Osório de Andrade. The contributions of public policies for strengthening family farming and increasing food security: the case of brazil. **Land Use Policy**, [S.L.], v. 82, p. 573-584, mar. 2019.

BERGER, Sarah; CHAZLI, Yassine El; BABU, Ambrin F.; COSTE, Alix T. Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: a consequence of antifungal use in agriculture?. **Frontiers In Microbiology**, 7 jun. 2017.

BERGER-PREIß, Edith; BOEHNCKE , Andrea; KÖNNECKER, Gustav; MANGELSDORF, Inge; HOLTHENRICH, Dagmar; KOCH, Wolfgang. Inhalational and dermal exposures during spray application of biocides. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, [S.L.], v. 208, n. 5, p. 357-372, set. 2005.

BERNABÒ, Ilaria; GUARDIA, Antonello; MACIRELLA, Rachele; SESTI, Settimio; CRESCENTE, Antonio; BRUNELLI, Elvira. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (Hyla intermedia). **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 172, p. 56-66, mar. 2016

BOLANOS-CARRIEL, Carlos; WEGULO, Stephen N.; BAENZIGER, P. Stephen; ESKRIDGE, Kent M.; FUNNELL-HARRIS, Deanna; MCMASTER, Niki; SCHMALE, David G.; HALLEN-ADAMS, Heather E.. Tri5 gene expression analysis during postharvest storage of wheat grain from field plots treated with a triazole and a strobilurin fungicide. **Canadian Journal Of Plant Pathology**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 547-559, 17 jan. 2020.

BOUHENNI RA, DUNMIRE J, SEWELL A, EDWARD DP. Animal models of glaucoma. **J Biomed Biotechnol** 2012.

BRAIN, Keith R.; WALTERS, Kenneth A.; WATKINSON, Adam C. Methods for studying percutaneous absorption. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, v. 119, p. 197-270, 2002.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 18, de 24 de Setembro de 2014. Diário Oficial da União 25 de setembro de 2014.

BRASIL. Decreto Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.

BRASIL. Lei nº 7.802, 11 de julho de 1989. Diário oficial da União, Brasília, DF, 12 de jul. 1989.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 294, de 29 de julho de 2019.

BRUNER, L. H. *et al*. Investigation of Ingredient Interactions in Cosmetic Formulations Using Isolated Bovine Corneas. v. 12, p. 669–690, 1998.

BUCOLO, Claudio; MALTESE, Adriana; DRAGO, Filippo. When nanotechnology meets the ocular surface. **Expert Review Of Ophthalmology**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 325-332, jun. 2008

ČADKOVÁ, Eva; KOMÁREK, Michael; KALISZOVÁ, Regina; KOUDELKOVÁ, Věra; DVOřÁK, Jiří; VANěK, Aleš. Sorption of tebuconazole onto selected soil minerals and humic acids. **Journal Of Environmental Science And Health, Part B**, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 336-342, abr. 2012.

CAO, Duantao; WU, Ruilin; DONG, Suxia; WANG, Feiyan; JU, Chao; YU, Sumei; XU, Shiji; FANG, Hua; YU, Yunlong. Triazole resistance in Aspergillus fumigatus in crop plant soil after tebuconazole applications. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 266, p. 115124, nov. 2020.

CAO, Fangjie; SOUDERS, Christopher L.; LI, Pengfei; PANG, Sen; QIU, Lihong; MARTYNIUK, Christopher J.. Developmental toxicity of the triazole fungicide cyproconazole in embryo-larval stages of zebrafish (Danio rerio). **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 4913-4923, 19 dez. 2018.

CARDOSO, Thalita Pedon de Araujo; KISHISHITA, Juliana; SOUZA, Asley Thalia Medeiros; VIEIRA, Jeymesson Raphael Cardoso; MELO, Cristiane Moutinho Lagos de; SANTANA, Davi Pereira de; LEAL, Leila Bastos. A proposed eye ex vivo permeation approach to evaluate pesticides: case dimethoate. **Toxicology In Vitro**, [S.L.], v. 66, p. 104833, ago. 2020.

CARVALHO, Deoclecio Lustosa de. **Aspectos críticos relacionados à avaliação de risco à saúde dos trabalhadores da agricultura familiar no sertão do São FranciscoERTÃO DO SÃO FRANCISCO**. 2022. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

CATTELAN, Márcia Denise Pavanelo; MAURER, Patrícia; GARCIA, Fernandez; BERRO, Lyana Feijoó; MACHADO, Michel Mansur; MANFREDINI, Vanusa; PICCOLI, Jacqueline da Costa Escobar. Occupational exposure to pesticides in family agriculture and the oxidative, biochemical and hematological profile in this agricultural model. **Life Sciences**, [S.L.], v. 203, p. 177-183, jun. 2018.

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. "PubChem Compound Summary for CID 6422843, Pyraclostrobin" *PubChem*, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyraclostrobin. Acessado em 6 de dezembro de 2022.

CEPAL – COMISSÃO ECONÔMICA PARA A AMÉRICA LATINA E O CARIBE. Panorama social de América Latina 2014.
CERVANTES-ZAPANA, Mirian; YAGÜE, Jose Luis; NICOLÁS, Víctor L. de; RAMIREZ, Alberto. Benefits of public procurement from family farming in Latin-AMERICAN countries: identification and prioritization. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 277, p. 123466, dez. 2020.

CHERUVU, P. S. N., Kompella, U. B. Bovine and Porcine Transscleral Solute Transport: Influence of Lipophilicity and the Choroid–Bruch's Layer. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, October 2006, Vol. 47, Nº. 10.

CHMIST, Joanna; SZOSZKIEWICZ, Krzysztof; DROŜDŜYńSKI, Dariusz. Behavioural Responses of Unio tumidus Freshwater Mussels to Pesticide Contamination. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 432-442, 4 jul. 2019.

CODEVASF - Companhia de desenvolvimento do Vale do São Francisco e Parnaíba. Os Vales: Vale do São Francisco, Impactos ambientais. Disponível em: https://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/o-desenvolvimento-do-vale-do-sao-franciscouma-historia-de-mais-de-70-anos, acesso em: 23 de janeiro de 2023.

COOPER, Jerry; DOBSON, Hans. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 1337-1348, set. 2007.

COUTURAUD, V. Biophysical characteristics of the skin in relation to race, sex, age, and site. 3ª Ed. **Informa Healthcare**, New York, 2009.

CROCOLI, Luana C.; ORTIZ, Rafael S.; MOURA, Sidnei. Application of qNMR for legal and illegal pesticides based on azoxystrobin, λ-cyhalothrin, imidacloprid, tebuconazole, and thiametoxan: a forensic case. **Forensic Chemistry**, [S.L.], v. 17, p. 100195, mar. 2020.
CROPLIFE BRASIL. Disponível em: https://croplifebrasil.org/conceitos/ghs-nova-classificacao-toxicologica-dos-defensivos-agricolas/. Acessado em: 18 de janeiro de 2023.

CUI, Ning; XU, Haoyu; YAO, Shijie; HE, Yiwen; ZHANG, Hongchao; YU, Yunlong. Chiral triazole fungicide tebuconazole: enantioselective bioaccumulation, bioactivity, acute toxicity, and dissipation in soils. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 25, p. 25468-25475, 27 jun. 2018

D'CRUZ, O. J.; ERBECK, D.; UCKUN, F. M. A study of the potential of the pig as a model for the vaginal irritancy of benzalkonium chloride in comparison to the nonirritant microbicide PHI-443 and the spermicide vanadocene dithiocarbamate**. Toxicologic pathology**, v. 33, n. 4, p. 465-476, 2005.

DAMALAS, Christos A.; ABDOLLAHZADEH, Gholamhossein. Farmers' use of personal protective equipment during handling of plant protection products: determinants of implementation. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 571, p. 730-736, nov. 2016.

DAMALAS, Christos; KOUTROUBAS, Spyridon. Farmers' Training on Pesticide Use Is Associated with Elevated Safety Behavior. **Toxics**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 19, 22 ago. 2017.

DAVIS, B. J.; TRAVLOS, G.; MCSHANE, T. Reproductive endocrinology and toxicological pathology over the life span of the female rodent. **Toxicologic pathology**, v. 29, n. 1, p. 77-83, 2001.

DEREUMEAUX, Clémentine; MERCIER, Fabien; SOULARD, Pauline; HULIN, Marion; OLEKO, Amivi; PECHEUX, Marie; FILLOL, Clémence; DENYS, Sébastien; QUENEL, Philippe. Identification of pesticides exposure biomarkers for residents living close to vineyards in France. **Environment International**, [S.L.], v. 159, p. 107013, jan. 2022.

DHANANJAYAN, V ;RAVICHANDRAN, B; PANJAKUMAR, K; KALAISELVI, K; RAJASEKAR, Kausic; A, Mala; G, Avinash; K, Shridhar; A, Manju; WILSON, Rajesh. Assessment of genotoxicity and cholinesterase activity among women workers occupationally exposed to pesticides in tea garden. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 841, p. 1-7, maio 2019.

DHANANJAYAN, V,; B, Ravichandran; K, Panjakumar; K, Kalaiselvi; RAJASEKAR, Kausic; A, Mala; G, Avinash; K, Shridhar; A, Manju; WILSON, Rajesh. Assessment of genotoxicity and cholinesterase activity among women workers occupationally exposed to pesticides in tea garden. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 841, p. 1-7, maio 2019.

DHANANJAYAN, Venugopal; RAVICHANDRAN, Beerappa. Occupational health risk of farmers exposed to pesticides in agricultural activities. **Current Opinion In Environmental Science & Health**, [S.L.], v. 4, p. 31-37, ago. 2018.

DOMINGUEZ, Alfredo Nicolás; EMMERT, Germán Ezequiel; GIL, Diego Mauricio; ÁLVAREZ, Rosa María Susana. Experimental and theoretical vibrational study of the fungicide pyraclostrobin. **Spectrochimica Acta Part A**: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, [S.L.], v. 259, p. 119888, out. 2021.

DONAHUE, D. A.; KAUFMAN, L. E.; AVALOS, J.; SIMION, F. A.; CERVEN, D. R. Survey of ocular irritation predictive capacity using Chorioallantoic Membrane Vascular Assay (CAMVA) and Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years. Toxicology in Vitro, 25(2), 563-572, 2011.

DOST, Kenan; ÖKSÜZ, Mertcan; CITTAN, Mustafa; MUTLU, Büşra; TURAL, Betül. Determination of boscalid, pyraclostrobin and trifloxystrobin in dried grape and apricot by HPLC/UV method. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [S.L.], v. 115, p. 104926, jan. 2023.

DOUGHTY, M. J., PETROU, S., MACMILLAN H. Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. **Can. J. Zool**. 73: 2159-2165 (1995).

DUBEY, Jatiender Kumar; PATYAL, Surender Kumar; KATNA, Sapna; SHANDIL, Deepika; DEVI, Nisha; SINGH, Gaganpreet; SINGH, Gagandeep. Persistence and dissipation kinetics of tebuconazole in apple, tomato, chilli and onion crops of Himachal Pradesh, India. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 27, n. 10, p. 11290-11302, 21 jan. 2020.

EFSA PANEL ON PLANT PROTECTION PRODUCTS AND THEIR RESIDUES (PPR). Scientific opinion on the science behind the revision of the guidance document on dermal absorption. **EFSA Journal**, v. 9, n. 7, p. 2294, 2011.

ELAHI, Ehsan; WEIJUN, Cui; ZHANG, Huiming; NAZEER, Majid. Agricultural intensification and damages to human health in relation to agrochemicals: application of artificial intelligence. **Land Use Policy**, [S.L.], v. 83, p. 461-474, abr. 2019.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) et al. Guidance on dermal absorption. **EFSA Journal**, v. 15, n. 6, p. e04873, 2017.

FABIAN, Eric; OESCH, Franz; OTT, Katharina; LANDSIEDEL, Robert; VAN RAVENZWAAY, Bennard. A protocol to determine dermal absorption of xenobiotica through human skin in vitro. **Archives Of Toxicology**, [S.L.], v. 91, n. 3, p. 1497-1511, 5 jul. 2017.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. "Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura." (2018).

FAO, Food et al. Food Outlook: biannual report on global food markets. 2018.

FENG, Ning; ZHANG, Bo; XIN, Xia; LI, Hongguang; ZHAO, Yonghong. Role of aliphatic alcohol polyoxyethylene ether phosphate in 25 wt% tebuconazole suspension concentrate: dispersion and wetting. **Colloids And Surfaces A**: Physicochemical and Engineering Aspects, [S.L.], v. 628, p. 127350, nov. 2021.

FILIPPI, Iohanna; LUCERO, Patricia; BONANSEA, Rocio I.; LERDA, Daniel; BUTINOF, Mariana; FERNANDEZ, Ricardo A.; WUNDERLIN, Daniel A.; AMÉ, María V.; MUÑOZ, Sonia E.. Validation of exposure indexes to pesticides through the analysis of exposure and effect biomarkers in ground pesticide applicators from Argentina. **Heliyon**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 07921, set. 2021.

FLATEN, Gøril Eide; PALAC, Zora; ENGESLAND, André; FILIPOVIć-GRčIć, Jelena; VANIć, Željka; ŀKALKO-BASNET, Nataša. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 75, p. 10-24, jul. 2015.

FLYNN, Thomas G.; DUNAWAY, Charlene M.; LAROCHELLE, Ethan; LYONS, Kathleen; KENNEDY, Linda S.; ROMANO, Megan E.; LI, Zhongze; SPALLER, Mark R.; CERVINSKI, Mark A.; BEJARANO, Suyapa. Reducing dermal exposure to agrochemical carcinogens using a fluorescent dye-based intervention among subsistence farmers in rural Honduras. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, [S.L.], v. 234, p. 113734, maio 2021.

FRANCO, SANDRA MARIA DE BRAGA. Tese de doutorado intitulada Determinação Óptica da Estrutura Tridimensional da Córnea apresentada a Universidade do Minho – Portugal, 2005

FRANSÉN, N.; WESTIN, U. Espefält; NYSTRÖM, C.; BJÖRK, E.. The in vitro transport of dihydroergotamine across porcine nasal respiratory and olfactory mucosa and the effect of a novel powder formulation. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 267-271, 2007.

FRANZ T. J.; LEHMAN P. A.; RANEY S. G. Percutaneous absorption in man: in vitro-*in vivo* correlation. **Skin Pharmacol Physiol**., v.24, n.4, p. 224-230, 2011.

FRASCH, H. Frederick. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. **Toxicology in vitro**, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2009

FU, Jiantao; LI, Zihao; HUANG, Rilin; WANG, Shiying; HUANG, Congling; CHENG, Dongmei; ZHANG, Zhixiang. Dissipation, residue, and distribution of pyraclostrobin in banana and soil under field conditions in South China. **International Journal Of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 96, n. 14, p. 1367-1377, 13 nov. 2016.

FUSTINONI, Silvia; MERCADANTE, Rosa; POLLEDRI, Elisa; RUBINO, Federico; COLOSIO, Claudio; MORETTO, Angelo. Biomonitoring human exposure to tebuconazole. **Toxicology Letters**, v. 211, p. 51, jun. 2012.

GANGEMI, Silvia; MIOZZI, Edoardo; TEODORO, Michele; BRIGUGLIO, Giusi; LUCA, Annamaria de; ALIBRANDO, Carmela; POLITO, Irene; LIBRA, Massimo. Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 4475-4488, 10 out. 2016.

GAO, Y. Y.; LI, X. X.; HE, L. F.; LI, B. X.; MU, W.; LIU, F.. Effect of Application Rate and Timing on Residual Efficacy of Pyraclostrobin in the Control of Pepper Anthracnose. **Plant Disease**, [S.L.], v. 104, n. 3, p. 958-966, mar. 2019.

GAO, Yang-Yang; HE, Li-Fei; LI, Bei-Xing; MU, Wei; LIN, Jin; LIU, Feng. Sensitivity of Colletotrichum acutatum to six fungicides and reduction in incidence and severity of chili anthracnose using pyraclostrobin. **Australasian Plant Pathology**, [S.L.], v. 46, n. 6, p. 521-528, 17 set. 2017.

GAO, Yangyang; YANG, Song; LI, Xiaoxu; HE, Lifei; ZHU, Jiamei; MU, Wei; LIU, Feng. Residue determination of pyraclostrobin, picoxystrobin and its metabolite in pepper fruit via UPLC-MS/MS under open field conditions. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 182, p. 109445, out. 2019.

GARCIA, E. G.; BUSSACOS, M. A.; FISCHER, F. M. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. **Rev. Saúde Publica** 2005; 39(5):832-9.

GARRIGOU, A., LAURENT, C., BERTHET, A., COLOSIO, C., JAS, N., DAUBAS-LETOURNEUX, V., JACKSON FILHO, J.M., JOUZEL, J.N., SAMUEL, O., BALDI, I., LEBAILLY, P., GALEY, L., GOUTILLE, F., JUDON, N., Critical review of the role of PPE in the prevention of risks related to agricultural pesticide use. **Saf Sci** 123,2020.

GAUDANA, Ripal; ANANTHULA, Hari Krishna; PARENKY, Ashwin; MITRA, Ashim K.. Ocular Drug Delivery. **The Aaps Journal**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 348-360, 1 maio 2010.

GESESEW, Hailay Abrha; WOLDEMICHAEL, Kifle; MASSA, Desalegn; MWANRI, Lillian. Farmers Knowledge, Attitudes, Practices and Health Problems Associated with Pesticide Use in Rural Irrigation Villages, Southwest Ethiopia. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 016-27, 13 set. 2016.

GODIN, B., TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo, ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews.** V. 59 p. 1152–1161, 2007.

GRAAF, L. de; BOULANGER, M.; BUREAU, M.; BOUVIER, G.; MERYET-FIGUIERE, M.; TUAL, S.; LEBAILLY, P.; BALDI, I.. Occupational pesticide exposure, cancer and chronic neurological disorders: a systematic review of epidemiological studies in greenspace workers. **Environmental Research**, [S.L.], v. 203, p. 111822, jan. 2022.

GRAEUB, Benjamin E.; CHAPPELL, M. Jahi; WITTMAN, Hannah; LEDERMANN, Samuel; KERR, Rachel Bezner; GEMMILL-HERREN, Barbara. The State of Family Farms in the World. **World Development**, [S.L.], v. 87, p. 1-15, nov. 2016.

GRILLO, Renato; FRACETO, Leonardo F.; AMORIM, Mónica J.B.; SCOTT-FORDSMAND, Janeck James; SCHOONJANS, Reinhilde; CHAUDHRY, Qasim. Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 404, p. 124148, fev. 2021.

GUO, Xinyan; WU, Wenzhu; SONG, Ninghui; LI, Juying; KONG, Deyang; KONG, Xiangji; HE, Jian; CHEN, Kuili; SHAN, Zhengjun. Residue dynamics and risk assessment of pyraclostrobin in rice, plants, hulls, field soil, and paddy water. **Human And Ecological Risk Assessment**: An International Journal, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 67-81, 23 set. 2016.

HE, Lei-Ming; CUI, Kai-Di; MA, Di-Cheng; SHEN, Rui-Ping; HUANG, Xue-Ping; JIANG, Jian-Gong; MU, Wei; LIU, Feng. Activity, Translocation, and Persistence of Isopyrazam for Controlling Cucumber Powdery Mildew. **Plant Disease**, [S.L.], v. 101, n. 7, p. 1139-1144, jul. 2017.

HENNING, A.; SCHAEFER, U. F.; NEUMANN, D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 324-331, 2009.

HERNÁNDEZ, Antonio F.; LÓPEZ, Olga; RODRIGO, Lourdes; GIL, Fernando; PENA, Gloria; SERRANO, José Luis; PARRÓN, Tesifón; ÁLVAREZ, Juan Carlos; LORENTE, José Antonio; PLA, Antonio. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 159, n. 1, p. 13-21, out. 2005.

HOU, Kaixuan; LU, Chengbo; SHI, Baihui; XIAO, Zongyuan; WANG, Xiaole; ZHANG, Jingwen; CHENG, Chao; MA, Junchao; DU, Zhongkun; LI, Bing. Evaluation of agricultural soil health after applying pyraclostrobin in wheat/maize rotation field based on the response of soil microbes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [S.L.], v. 340, p. 108186, dez. 2022.

HUANG, Xueping; YANG, Song; LI, Beixing; WANG, Aiping; LI, Hong; LI, Xiuhuan; LUO, Jian; LIU, Feng; MU, Wei. Comparative toxicity of multiple exposure routes of pyraclostrobin in adult zebrafish (Danio rerio). **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 777, p. 145957, jul. 2021.

HUGHES, P; OLEJNIK, O; CHANGLIN, J; WILSON, C. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 57, n. 14, p. 2010-2032, 13 dez. 2005.

IBGE. INTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/pe/belem-do-sao-francisco.html, acesso em: 23 de janeiro de 2023.

ILYUSHINA, Nataliya A.; EGOROVA, Olga V.; MASALTSEV, Gleb V.; AVERIANOVA, Nataliya S.; REVAZOVA, Yulia A.; RAKITSKII, Valerii N.; GOUMENOU, Marina; VARDAVAS, Alexander; STIVAKTAKIS, Polychronis; TSATSAKIS, Aristidis. Genotoxicity of mixture of imidacloprid, imazalil and tebuconazole. **Toxicology Reports**, [S.L.], v. 7, p. 1090-1094, 2020.

ŀULC, Libor; JANOŁ, Tomáš; FIGUEIREDO, Daniel; OTTENBROS, Ilse; ŀENK, Petr; MIKEŁ, Ondřej; HUSS, Anke; ČUPR, Pavel. Pesticide exposure among Czech adults and children from the CELSPAC-SPECIMEn cohort: urinary biomarker levels and associated health risks. **Environmental Research**, [S.L.], v. 214, p. 114002, nov. 2022.

INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada: Portaria n.o 455-A/2010, de 30 de Junho. 2010.

IWATSUKI-HORIMOTO, Kiyoko; NAKAJIMA, Noriko; SHIBATA, Masatoshi; TAKAHASHI, Kenta; SATO, Yuko; KISO, Maki; YAMAYOSHI, Seiya; ITO, Mutsumi; ENYA, Satoko; OTAKE, Masayoshi. The Microminipig as an Animal Model for Influenza A Virus Infection. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 91, n. 2, p. 1-6, 15 jan. 2017

JÓNSDÓTTIR, Svava Ósk; REFFSTRUP, Trine Klein; PETERSEN, Annette; NIELSEN, Elsa. Physicologically Based Toxicokinetic Models of Tebuconazole and Application in Human Risk Assessment. **Chemical Research In Toxicology**, [S.L.], v. 29, n. 5, p. 715-734, 29 abr. 2016.

JURAŁEKOVÁ, Zuzana; JUTKOVÁ, Annamária; KOžÁR, Tibor; STANIčOVÁ, Jana. Vibrational characterization of the pesticide molecule Tebuconazole. **Spectrochimica Acta Part A**: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, [S.L.], v. 268, p. 120629, mar. 2022.

KAH, Melanie; KOOKANA, Rai Singh; GOGOS, Alexander; BUCHELI, Thomas Daniel. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 677-684, 7 maio 2018.

KANG-MIELER, Jennifer J; OSSWALD, Christian R; MIELER, William F. Advances in ocular drug delivery: emphasis on the posterior segment. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 1647-1660, 30 jun. 2014.

KASIOTIS, Konstantinos M.; TSAKIRAKIS, Angelos N.; GLASS, C. Richard; CHARISTOU, Agathi N.; ANASTASSIADOU, Pelagia; GERRITSEN-EBBEN, Rianda; MACHERA, Kyriaki. Assessment of field re-entry exposure to pesticides: a dislodgeable foliar residue study. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 596-597, p. 178-186, out. 2017.

KATSIKANTAMI, Ioanna; COLOSIO, Claudio; ALEGAKIS, Athanasios; TZATZARAKIS, Manolis N.; VAKONAKI, Elena; RIZOS, Apostolos K.; SARIGIANNIS, Dimosthenis A.; TSATSAKIS, Aristides M.. Estimation of daily intake and risk assessment of organophosphorus pesticides based on biomonitoring data – The internal exposure approach. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 123, p. 57-71, jan. 2019.

KATTAN, E; ABSILL, C. S.; HAIDAR, S. Transdermal testing: Practical aspects and methods. **Pharm. Sci. Technol. Today**, v.3(12), p.426-430, 2000.
KOVAčEVIć, Marija; HACKENBERGER, Davorka K.; HACKENBERGER, Branimir K.. Effects of strobilurin fungicides (azoxystrobin, pyraclostrobin, and trifloxystrobin) on survival, reproduction and hatching success of Enchytraeus crypticus. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 790, p. 148143, out. 2021.

KU, Tingting; ZHOU, Mengmeng; HOU, Yanwen; XIE, Yuanyuan; LI, Guangke; SANG, Nan. Tebuconazole induces liver injury coupled with ROS-mediated hepatic metabolism disorder. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 220, p. 112309, set. 2021.

KUMAR, N.; WILLIS, A.; SATBHAI, K.; RAMALINGAM, L.; SCHMITT, C.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CRAGO, J.. Developmental toxicity in embryo-larval zebrafish (Danio rerio) exposed to strobilurin fungicides (azoxystrobin and pyraclostrobin). **Chemosphere**, [S.L.], v. 241, p. 124980, fev. 2020.

KUMAR, Sandeep; NEHRA, Monika; DILBAGHI, Neeraj; MARRAZZA, Giovanna; HASSAN, Ashraf Aly; KIM, Ki-Hyun. Nano-based smart pesticide formulations: emerging opportunities for agriculture. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 294, p. 131-153, jan. 2019.

KUMAR, Vinod; KUMAR, Piyush. Pesticides in agriculture and environment: Impacts on human health. Contaminants in agriculture and environment**: health risks and remediation**, v. 1, p. 76-95, 2019.

LAPIERRE, Lisette; QUINTREL, Marianela; LAGOS-SUSAETA, Francisco; HERVÉ-CLAUDE, Luis Pablo; RIQUELME, Ricardo; OVIEDO, Pilar; MAINO, Mario; CORNEJO, Javiera. Assessment of Antimicrobial and Pesticide Residues in Food Products Sourced from Peasant Family Farming in Chile. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 82, n. 9, p. 1583-1590, set. 2019.

LEAL, L. B., *et al*. Bioequivalence Methodologies for Topical Drug Products: In Vitro and Ex Vivo Studies with a Corticosteroid and an Anti-Fungal. **Drug. Pharm Res**., v. 34, p. 730-737, 2017.

LI, Hequn; ZHANG, Mengying; VERVOORT, Jacques; RIETJENS, Ivonne M.C.M.; VAN RAVENZWAAY, Bennard; LOUISSE, Jochem. Use of physiologically based kinetic modeling-facilitated reverse dosimetry of in vitro toxicity data for prediction of in vivo developmental toxicity of tebuconazole in rats. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 266, p. 85-93, jan. 2017.

LI, Hong; JING, Tongfang; LI, Tongbin; HUANG, Xueping; GAO, Yangyang; ZHU, Jiamei; LIN, Jin; ZHANG, Peng; LI, Beixing; MU, Wei. Ecotoxicological effects of pyraclostrobin on tilapia (Oreochromis niloticus) via various exposure routes. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 285, p. 117188, set. 2021.

LI, Hong; YANG, Song; LI, Tongbin; LI, Xiuhuan; HUANG, Xueping; GAO, Yangyang; LI, Beixing; LIN, Jin; MU, Wei. Determination of pyraclostrobin dynamic residual distribution in tilapia tissues by UPLC-MS/MS under acute toxicity conditions. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 206, p. 111182, dez. 2020.

LI, Hui; CAO, Fangjie; ZHAO, Feng; YANG, Yang; TENG, Miaomiao; WANG, Chengju; QIU, Lihong. Developmental toxicity, oxidative stress and immunotoxicity induced by three strobilurins (pyraclostrobin, trifloxystrobin and picoxystrobin) in zebrafish embryos. **Chemosphere**, [S.L.], v. 207, p. 781-790, set. 2018.

LI, Mingwei; XU, Weiming; HU, Deyu; SONG, Baoan. Preparation and application of pyraclostrobin microcapsule formulations. **Colloids And Surfaces A**: Physicochemical and Engineering Aspects, [S.L.], v. 553, p. 578-585, set. 2018.

LI, Shuying; JIANG, Yao; SUN, Qianqian; COFFIN, Scott; CHEN, Lili; QIAO, Kun; GUI, Wenjun; ZHU, Guonian. Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (Danio rerio). **Chemosphere**, [S.L.], v. 241, p. 125129, fev. 2020.

LI, Shuying; SUN, Qianqian; WU, Qiong; GUI, Wenjun; ZHU, Guonian; SCHLENK, Daniel. Endocrine disrupting effects of tebuconazole on different life stages of zebrafish (Danio rerio). **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 249, p. 1049-1059, jun. 2019.

LI, Yuanbo; DONG, Fengshou; LIU, Xingang; XU, Jun; LI, Jing; KONG, Zhiqiang; CHEN, Xiu; ZHENG, Yongquan. Enantioselective determination of triazole fungicide tebuconazole in vegetables, fruits, soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal Of Separation Science**, v. 35, n. 2, p. 206-215, 12 dez. 2012.

LIANG, You; SONG, Jiehui; DONG, Hongqiang; HUO, Zhongyang; GAO, Yunhao; ZHOU, Zhiyuan; TIAN, Yuyang; LI, Yan; CAO, Yongsong. Fabrication of pH-responsive nanoparticles for high efficiency pyraclostrobin delivery and reducing environmental impact. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 787, p. 147422, set. 2021

LICINA, D., MORRISON, G.C., BEKÖ, G., WESCHLER, C.J., NAZAROFF, W.W., 2019. Clothing-Mediated Exposures to Chemicals and Particles.
Environ. Sci. Technol. *53*(10), 5559-5575.

LIN, Lu; XU, Xinxin; SONG, Shanshan; XU, Liguang; WU, Xiaoling; LIU, Liqiang; KUANG, Hua; XU, Chuanlai. A multiplex lateral flow immunochromatography assay for the quantitative detection of pyraclostrobin, myclobutanil, and kresoxim-methyl residues in wheat. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 377, p. 131964, maio 2022.

LIU, Xiangwu; YANG, Ya; CHEN, Ya; ZHANG, Qingtao; LU, Ping; HU, Deyu. Dissipation, residues and risk assessment of oxine-copper and pyraclostrobin in citrus. **Food Additives & Contaminants**: Part A, [S.L.], v. 36, n. 10, p. 1538-1550, 30 jul. 2019.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: RJ; 2011.
LOPES, P. M. O.; DE MOURA, S. S. Estudo de caso: índice de umidade do solo utilizando imagens do sensor MODIS para o município de Belém do São Francisco, PE. I Workshop Internacional Sobre Água no Semiárido Brasileiro, 2013.

LUAN, Shaorong; CHEN, Yongjun; WANG, Xiaohua; YAN, Dongmei; XU, Jialin; CUI, Hairong; HUANG, Qingchun. Synergy of cystamine and pyraclostrobin against Fusarium graminearum involves membrane permeability mitigation and autophagy enhancement. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 188, p. 105287, nov. 2022.

LUDWIG, Cassie A.; MOON, Jade; GARG, Itika; MILLER, John B.. Ultra-Widefield Imaging for Evaluation of the Myopic Eye. **Seminars In Ophthalmology**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 185-190, 23 fev. 2021.

MA, Feifei; LI, Yang; YU, Yige; LI, Zengqiang; LIN, Liben; CHEN, Quanxu; XU, Qiang; PAN, Peipei; WANG, Yiyan; GE, Ren-Shan. Gestational exposure to tebuconazole affects the development of rat fetal Leydig cells. **Chemosphere**, [S.L.], v. 262, p. 127792, jan. 2021.

MA, Junchao; CHENG, Chao; DU, Zhongkun; LI, Bing; WANG, Jinhua; WANG, Jun; WANG, Zuobin; ZHU, Lusheng. Toxicological effects of pyraclostrobin on the antioxidant defense system and DNA damage in earthworms (Eisenia fetida). **Ecological Indicators**, [S.L.], v. 101, p. 111-116, jun. 2019.

MACHADO, Rita Monteiro; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, Ana; GASPAR, Carlos; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, José; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, Rita. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 92, p. 14-26, set. 2015

MACIRELLA, Rachele; TRIPEPI, Manuela; BRUNELLI, Elvira. Morphological and Immunohistochemical Modifications in Zebrafish (Danio rerio) Gills After Short-Term Exposure to the Fungicide Tebuconazole. **Zebrafish**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 65-76, fev. 2019.

MAHMOOD, Isra; IMADI, Sameen Ruqia; SHAZADI, Kanwal; GUL, Alvina; HAKEEM, Khalid Rehman. Effects of Pesticides on Environment. **Plant, Soil And Microbes**, [S.L.], p. 253-269, 2016.

MALHAT, Farag; SABER, El-Sayed; SHOKR, Shokr Abd Elsalam; AHMED, Mohamed Tawfic; AMIN, Alaa El-Sayed. Consumer safety evaluation of pyraclostrobin residues in strawberry using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS): an egyptian profile. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 108, p. 104450, nov. 2019.

MANDIC-RAJCEVIC, Stefan; RUBINO, Federico Maria; ARIANO, Eugenio; COTTICA, Danilo; NEGRI, Sara; COLOSIO, Claudio. Exposure duration and absorbed dose assessment in pesticide-exposed agricultural workers: implications for risk assessment and modeling. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, [S.L.], v. 222, n. 3, p. 494-502, abr. 2019.

MAO, Liangang; JIA, Wei; ZHANG, Lan; ZHANG, Yanning; ZHU, Lizhen; SIAL, Muhammad Umair; JIANG, Hongyun. Embryonic development and oxidative stress effects in the larvae and adult fish livers of zebrafish (Danio rerio) exposed to the strobilurin fungicides, kresoxim-methyl and pyraclostrobin. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 729, p. 139031, ago. 2020.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2020. Fungicida. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em 6 de dezembro de 2022.

MARETE, Gabriel M.; LALAH, Joseph O.; MPUTHIA, Jane; WEKESA, Vitalis W.. Pesticide usage practices as sources of occupational exposure and health impacts on horticultural farmers in Meru County, Kenya. **Heliyon**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 06118, fev. 2021.

MEDINA, Gabriel; ALMEIDA, Camila; NOVAES, Evandro; GODAR, Javier; POKORNY, Benno. Development Conditions for Family Farming: lessons from brazil. **World Development**, [S.L.], v. 74, p. 386-396, out. 2015.

MEHMOOD, Yasir; ARSHAD, Muhammad; MAHMOOD, Nasir; KÄCHELE, Harald; KONG, Rong. Occupational hazards, health costs, and pesticide handling practices among vegetable growers in Pakistan. **Environmental Research**, [S.L.], v. 200, p. 111340, set. 2021.

MEMON, Qurat Ul Ain; WAGAN, Shoaib Ahmed; CHUNYU, Dong; SHUANGXI, Xiao; JINGDONG, Luan; DAMALAS, Christos A.. Health problems from pesticide exposure and personal protective measures among women cotton workers in southern Pakistan. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 685, p. 659-666, out. 2019.

MERCADANTE, Rosa; POLLEDRI, Elisa; MORETTO, Angelo; FUSTINONI, Silvia. Long-term occupational and environmental exposure to penconazole and tebuconazole by hair biomonitoring. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 298, p. 19-24, dez. 2018.

MERCADANTE, Rosa; POLLEDRI, Elisa; RUBINO, Federico Maria; MANDIC-RAJCEVIC, Stefan; VAIANI, Andrea; COLOSIO, Claudio; MORETTO, Angelo; FUSTINONI, Silvia. Assessment of penconazole exposure in winegrowers using urinary biomarkers. **Environmental Research**, [S.L.], v. 168, p. 54-61, jan. 2019.

MERCADER, Josep V.; AGULLÓ, Consuelo; ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A.; ABAD-SOMOVILLA, Antonio; ABAD-FUENTES, Antonio. Immunoassays for pyraclostrobin analysis in processed food products using novel monoclonal antibodies and QuEChERS-based extracts. **Food Control**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 42-48, jul. 2013.

MOFIDFAR, Mohammad; ABDI, Behnam; AHADIAN, Samad; MOSTAFAVI, Ebrahim; DESAI, Tejal A.; ABBASI, Farhang; SUN, Yang; MANCHE, Edward E.; TA, Christopher N.; FLOWERS, Charles W.. Drug delivery to the anterior segment of the eye: a review of current and future treatment strategies. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 607, p. 120924, set. 2021.

MOHSIN, Sayed; HASANUZZAMAN, Mirza; BHUYAN, M.; PARVIN, Khursheda; FUJITA, Masayuki. Exogenous Tebuconazole and Trifloxystrobin Regulates Reactive Oxygen Species Metabolism Toward Mitigating Salt-Induced Damages in Cucumber Seedling. **Plants**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 428, 18 out. 2019.

MORRISON, Peter Wj; KHUTORYANSKIY, Vitaliy V. Advances in ophthalmic drug delivery. **Therapeutic Delivery**, [S.L.], v. 5, n. 12, p. 1297-1315, dez. 2014.

MOSHOU, H.; KARAKITSOU, A.; YFANTI, F.; HELA, D.; VLASTOS, D.; PASCHALIDOU, A.K.; KASSOMENOS, P.; PETROU, I.. Assessment of genetic effects and pesticide exposure of farmers in NW Greece. **Environmental Research**, [S.L.], v. 186, p. 109558, jul. 2020.

MUN EA, et al. On the Barrier Properties of the Cornea: A Microscopy Study of the Penetration of Fluorescently Labeled Nanoparticles, Polymers, and Sodium Fluorescein Mol Pharm. 2014 Oct 6;11(10):3556-64. doi: 10.1021/mp500332m. Epub Aug 28, 2014.

NAFISI, Shohreh; MAIBACH, Howard I.. Skin penetration of nanoparticles. **Emerging Nanotechnologies In Immunology**, [S.L.], p. 47-88, 2018.

NARKAR, Y. Bioequivalence for Topical Products—An Update. Pharmaceutical Research, v. 27, p. 2590-2601, 2010.

NDAYAMBAJE, Benjamin; AMUGUNI, Hellen; COFFIN-SCHMITT, Jeanne; SIBO, Nancy; NTAWUBIZI, Martin; VANWORMER, Elizabeth. Pesticide Application Practices and Knowledge among Small-Scale Local Rice Growers and Communities in Rwanda: a cross-sectional study. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 16, n. 23, p. 4770, 28 nov. 2019.

NEUPANE, Rabin; BODDU, Sai H.s.; RENUKUNTLA, Jwala; BABU, R. Jayachandra; TIWARI, Amit K.. Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: current trends and possibilities. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 152, 13 fev. 2020.

OECD. Guideline for the testing of chemical, nº 428. Skin Absorption: in vitro Method, Paris, France, 2004.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.Section 4: Health Effects. 2013.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals.Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Section 4: Health Effects. 2009.

OERLEMANS, A.; VAN DAEL, M.F.P.; VERMEULEN, R.C.H.; RUSSEL, F.G.M.; SCHEEPERS, P.T.J. Urine collection methods for non-toilet-trained children in biological monitoring studies: validation of a disposable diaper for characterization of tebuconazole exposure. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 298, p. 201-206, dez. 2018.

OERLEMANS, A.; VERSCHEIJDEN, L. F. M.; MOL, J. G. J.; VERMEULEN, R. C. H.; WESTERHOUT, J.; ROELEVELD, N.; RUSSEL, F. G. M.; SCHEEPERS, P. T. J.. Toxicokinetics of a urinary metabolite of tebuconazole following controlled oral and dermal administration in human volunteers. **Archives Of Toxicology**, [S.L.], v. 93, n. 9, p. 2545-2553, 29 jul. 2019.

OLIVEIRA, A.G.L.; SILVA, R.S; ALVES, E.N.; PRESGRAVE, R.F.; PRESGRAVE, O.A.F; DELGADO, I.F. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. **Rev Inst Adolfo Lutz.** 71(1):153-9, 2012.

OLIVEIRA, Luiz Alberto Bandeira de; PACHECO, Henrique Poltronieri; SCHERER, Rodrigo. Flutriafol and pyraclostrobin residues in Brazilian green coffees. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 190, p. 60-63, jan. 2016.

ONU- Organização das Nações Unidas. Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil, 2019.

ONUGWU, Adaeze Linda; NWAGWU, Chinekwu Sherridan; ONUGWU, Obinna Sabastine; ECHEZONA, Adaeze Chidiebere; AGBO, Chinazom Precious; IHIM, Stella Amarachi; EMEH, Prosper; NNAMANI, Petra Obioma; ATTAMA, Anthony Amaechi; KHUTORYANSKIY, Vitaliy V.. Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 354, p. 465-488, fev. 2023

ÖSTH, Karin; GRÅSJÖ, Johan; BJÖRK, Erik. A New Method for Drug Transport Studies on Pig Nasal Mucosa Using a Horizontal Ussing Chamber. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 91, n. 5, p. 1259-1273, maio 2002.

OTHMÈNE, Yosra Ben; HAMDI, Hiba; AMARA, Ines; ABID-ESSEFI, Salwa. Tebuconazole induced oxidative stress and histopathological alterations in adult rat heart. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 170, p. 104671, nov. 2020.

OTHMÈNE, Yosra Ben; HAMDI, Hiba; ANNABI, Emna; AMARA, Ines; SALEM, Intidhar Ben; NEFFATI, Fadwa; NAJJAR, Mohamed Fadhel; ABID-ESSEFI, Salwa. Tebuconazole induced cardiotoxicity in male adult rat. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 137, p. 111134, mar. 2020.

OTHMÈNE, Yosra Ben; MONCEAUX, Kevin; KAROUI, Ahmed; SALEM, Intidhar Ben; BELHADEF, Anissa; ABID-ESSEFI, Salwa; LEMAIRE, Christophe. Tebuconazole induces

ROS-dependent cardiac cell toxicity by activating DNA damage and mitochondrial apoptotic pathway. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 204, p. 111040, nov. 2020.

PANDA, Smaranika; ZHOU, Kang. Engineering microbes to overproduce natural products as agrochemicals. **Synthetic And Systems Biotechnology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 79-85, mar. 2023.

PARK, Eunyoung; LEE, Jiho; LEE, Junghak; LEE, Jonghwa; LEE, Hye Suk; SHIN, Yongho; KIM, Jeong-Han. Method for the simultaneous analysis of 300 pesticide residues in hair by LC-MS/MS and GC-MS/MS, and its application to biomonitoring of agricultural workers. **Chemosphere**, [S.L.], v. 277, p. 130215, ago. 2021.

PENNESI ME, NEURINGER M, COURTNEY RJ. Animal models of age related macular degeneration. **Mol Aspects Med,** 33: 487-509, 2012.

PERES, F. J., MOREIRA, C., DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: Peres, F.; Moreira, J. C. (Org.) É Veneno ou é Remédio? - agrotóxicos, saúde e ambiente, 1. ed. Rio de Janeiro: ed. FIOCRUZ. 2003.

PEREZ-RODRIGUEZ, Veronica; SOUDERS, Christopher L.; TISCHUK, Claire; MARTYNIUK, Christopher J.. Tebuconazole reduces basal oxidative respiration and promotes anxiolytic responses and hypoactivity in early-staged zebrafish (Danio rerio). **Comparative Biochemistry And Physiology Part C**: Toxicology & Pharmacology, [S.L.], v. 217, p. 87-97, mar. 2019.

PERNAMBUCO. Agência de Planejamento e Pesquisa do Estado de Pernambuco – CONDEPE/FIDEM. Plano de Desenvolvimento Regional Sustentável do Município de Salgueiro e seu Entorno. Recife: [s.n.]. 2017.

PETRINI, Maria Angélica; ROCHA, Jansle Vieira; BROWN, J. Christopher; BISPO, Rafael Carlos. Using an analytic hierarchy process approach to prioritize public policies addressing family farming in Brazil. **Land Use Policy**, [S.L.], v. 51, p. 85-94, fev. 2016.

PIMENTÃO, Ana Rita; PASCOAL, Cláudia; CASTRO, Bruno B.; CÁSSIO, Fernanda. Fungistatic effect of agrochemical and pharmaceutical fungicides on non-target aquatic decomposers does not translate into decreased fungi- or invertebrate-mediated decomposition. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 712, p. 135676, abr. 2020.

POLLEDRI, E.; MERCADANTE, R.; NIJSSEN, R.; CONSONNI, D.; MOL, H.; FUSTINONI, S.. Hair as a matrix to evaluate cumulative and aggregate exposure to pesticides in winegrowers. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 687, p. 808-816, out. 2019.

POLONINI, Hudson Caetano; SOLDATI, Pedro Paulo; ALMEIDA, Priscila Aparecida de; SILVA, Carla Grazieli Azevedo da; COLLINS, Carol Hollingworth; OLIVEIRA, Marcone Augusto Leal de; FERREIRA, Anderson de Oliveira; RAPOSO, Nádia Rezende Barbosa; BRANDÃO, Marcos Antônio Fernandes. Permeation profiles of resveratrol cream delivered through porcine vaginal mucosa: evaluation of different hplc stationary phases. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1002, p. 8-12, out. 2015.

PRICE, Claire L; PARKER, Josie e; WARRILOW, Andrew Gs; KELLY, Diane e; KELLY, Steven L. Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 71, n. 8, p. 1054-1058, 20 maio 2015.

PROTANO, Carmela; GUIDOTTI, Maurizio; VITALI, Matteo. Performance of different work clothing types for reducing skin exposure to pesticides during open field treatment. Bulletin of Environmental **Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 1, p. 115- 119, 2009.

RAJAO, D. S.; VINCENT, A. L.. Swine as a Model for Influenza A Virus Infection and Immunity. **Ilar Journal**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 44-52, 19 maio 2015.

RAMOS, Tiago; SCOTT, Deborah; AHMAD, Sajjad. An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells: cornea and conjunctiva. **Stem Cells International**, [S.L.], v. 2015

REILLY, Timothy J.; SMALLING, Kelly L.; ORLANDO, James L.; KUIVILA, Kathryn M.. Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States. **Chemosphere**, [S.L.], v. 89, n. 3, p. 228-234, set. 2012.

RHEIN, L. D.; PEOPLES, C.; WOLF, B. Skin, hair and nail structure and function. 4ª Ed. Allured Books, Carol Stream-Illinois, 2009.

RICHTER, T.; KEIPERT, S. In vitro permeation studies comparing bovine nasal mucosa, porcine cornea and artificial membrane: androstenedione in microemulsions and their components. v. 58, p. 137–143, 2004.

RINCÓN, Víctor J.; PÁEZ, Francisco C.; SÁNCHEZ-HERMOSILLA, Julián. Potential dermal exposure to operators applying pesticide on greenhouse crops using low-cost equipment. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 630, p. 1181-1187, jul. 2018.

RISK, Manage Your. Signs and Symptoms of Pesticide Poisoning.2001

RIZVI, Syed Arif Hussain; XIE, Feng; LING, Siquan; ZENG, Xinnian. Development and evaluation of emulsifiable concentrate formulation containing Sophora alopecuroides L. extract for the novel management of Asian citrus psyllid. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 26, n. 21, p. 21871-21881, 28 maio 2019.

ROCCO, Kevin; MARGOUM, Christelle; RICHARD, Loïc; COQUERY, Marina. Enhanced database creation with in silico workflows for suspect screening of unknown tebuconazole transformation products in environmental samples by UHPLC-HRMS. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 440, p. 129706, out. 2022.

SAAD-HUSSEIN, Amal; BESHIR, Safia; TAHA, Mona M.; SHAHY, Eman M.; SHAHEEN, Weam; ABDEL-SHAFY, Ebtesam A.; THABET, Eman. Early prediction of liver carcinogenicity due to occupational exposure to pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 838, p. 46-53, fev. 2019.

SÁNCHEZ, A.; AZOR, C.; ARAGÓN, A.; GARCÍA, D.P. Concentración de aminoácidos en el vítreo en una población control. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología v.77 n.11 Madrid nov. 2002.

SANOJA-LÓPEZ, Kelvin Adrian; QUIROZ-SUÁREZ, Kevin Alberto; DUEÑAS-RIVADENEIRA, Alex Alberto; MADDELA, Naga Raju; MONTENEGRO, Maria C.B.s. M.; LUQUE, Rafael; RODRÍGUEZ-DÍAZ, Joan Manuel. Polymeric membranes functionalized with nanomaterials (MP@NMs): a review of advances in pesticide removal. **Environmental Research**, [S.L.], v. 217, p. 114776, jan. 2023.

SANTANA, Marthony Dornelas; LEITE, Iris Carolina Henrique de Lima; SANTOS, Ivonaldo Carlos da Silva; MICHEREFF, Sami Jorge; FREITAS-LOPES, Rejane do Livramento; LOPES, Ueder Pedro. Reduction of cladode brown spot in cactus pear in semiarid growing areas and yield increase using fungicides. **Journal Of Plant Pathology**, [S.L.], v. 102, n. 2, p. 517-522, 8 jan. 2020.

SANTOS-MIRANDA, Artur; JOVIANO-SANTOS, Julliane V.; CRUZ-NASCIMENTO, Taynara; NERI, Elida Adalgisa; SOUZA, Diego Santos; MARQUES, Leisiane Pereira; KRIEGER, Jose E.; ROMAN-CAMPOS, Danilo. The fungicide Tebuconazole induces electromechanical cardiotoxicity in murine heart and human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells. **Toxicology Letters**, v. 359, p. 96-105, abr. 2022.

SANYAL, Shalini; LAW, Atrayo; LAW, Sujata. Chronic pesticide exposure and consequential keratectasia & corneal neovascularisation. **Experimental eye research**, v. 164, p. 1-7, 2017

SAWERES-ARGÜELLES, Clara; RAMÍREZ-NOVILLO, Icíar; VERGARA-BARBERÁN, María; CARRASCO-CORREA, Enrique Javier; LERMA-GARCÍA, María Jesús; SIMÓ-ALFONSO, Ernesto Francisco. Skin absorption of inorganic nanoparticles and their toxicity:

a review. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [S.L.], v. 182, p. 128-140, jan. 2023.

SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 51-56, 2001.

SCHREINEMACHERS, Pepijn; TIPRAQSA, Prasnee. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 616-626, dez. 2012.

SCHUMMER, Claude; SALQUÈBRE, Guillaume; BRIAND, Olivier; MILLET, Maurice; APPENZELLER, Brice M.R. Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis. **Toxicology Letters** v. 210, n. 2, p. 203-210, abr. 2012.

SCOTT, L. et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using bottom–up and top–down approaches. Toxicology in Vitro, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2010.

SHAHID, Mohammad; KHAN, Mohammad Saghir. Ecotoxicological implications of residual pesticides to beneficial soil bacteria: a review. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 188, p. 105272, nov. 2022.

SHAHINASI, Edlira *et al*. THE ECOTOXICOLOGY OF PESTICIDES GROUP OF TRIAZOLE AND THEIR USE TO CONTROL APPLE SCAB (VENTURIA INAEQUALIS). **Journal Of Hygienic Engineering And Design**, Albania, v. 1, n. 1, p. 36-42, ago. 2017.

SHALINI, SANYAL; PROSUN, DAS; SUJATA, LAW CELL. Effect of chronic pesticide exposure on murine cornea: a histopathological, cytological and flow cytometric approach to study ocular damage by xenobiotics **Biol Toxicol,** 2016.

SHARMA, Krishan Kumar; TRIPATHY, Vandana; RAO, Cherkuri Sreenivasa; BHUSHAN, Vemuri Shashi; REDDY, Karthika Narasimha; JYOT, Gagan; SAHOO, Sanjay Kumar; SINGH, Balwinder; MANDAL, Kaushik; BANERJEE, Hemanta. Persistence, dissipation, and risk assessment of a combination formulation of trifloxystrobin and tebuconazole fungicides in/on tomato. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 108, p. 104471, nov. 2019.

SHEN, J. et al. An in silico skin absorption model for fragrance materials. Food and Chemical Toxicology. USA, v.74, p.164–176, 2014.

SHERSHNEVA, Anna M.; MURUEVA, Anastasia V.; ZHILA, Natalia O.; VOLOVA, Tatiana G.. Antifungal activity of P3HB microparticles containing tebuconazole. **Journal Of Environmental Science And Health, Part B**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 196-204, 12 jan. 2019.

SHI, Wenhui; LI, Shiqing; WANG, Xiaoyan; LI, Shujing; ZHANG, Xiaojun; HOU, Fuding. An electrostatic self-assembly approach to prepare tebuconazole nanoparticles with improved sustained release and enhanced antifungal activity. **Colloids And Surfaces B**: Biointerfaces, v. 216, p. 112587, ago. 2022.

SHISHATSKAYA, Ekaterina; MENZYANOVA, Natalia; ZHILA, Natalia; PRUDNIKOVA, Svetlana; VOLOVA, Tatiana; THOMAS, Sabu. Toxic effects of the fungicide tebuconazole on the root system of fusarium-infected wheat plants. **Plant Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 132, p. 400-407, nov. 2018.

SILVA, José Alexandro et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SIMON, A. et al. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. International Journal of Pharmaceutics, v. 512, n. 1, p. 234-241, 2016.

SOUZA, N.V. Doenças do corpo vítreo, retina e uveíte. Medicina, Simpósio: Oftalmologia para o clínico. 30: 69-73, jan./mar. 1997.

SQUIER, C. A.; MANTZ, M. J.; SCHLIEVERT, P. M.; DAVIS, C. C. et al. Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. **Journal of pharmaceutical sciences,** v. 97, n. 1, p. 9-21, 2008.

STARBÆK, Sofie M R; BROGAARD, Louise; DAWSON, Harry D; SMITH, Allen D; HEEGAARD, Peter M H; LARSEN, Lars e; JUNGERSEN, Gregers; SKOVGAARD, Kerstin. Animal Models for Influenza A Virus Infection Incorporating the Involvement of Innate Host Defenses: enhanced translational value of the porcine model. **Ilar Journal**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 323-337, 2018.

SUGANTHI, A.; RAJESWARI, E.; SIVAKUMAR, V.; BHUVANESWARI, K.; SUDHANAN, E. Madhu; SATHIAH, N.; PRABAKARAN, K.. Analysis of tebuconazole residues in coconut water, kernel and leaves using LC–MS/MS. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 359, p. 129920, out. 2021.

SUN, Tong; MIAO, Jingbo; SALEEM, Muhammad; ZHANG, Haonan; YANG, Yong; ZHANG, Qingming. Bacterial compatibility and immobilization with biochar improved tebuconazole degradation, soil microbiome composition and functioning. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 398, p. 122941, nov. 2020.

TADEI, Rafaela; DOMINGUES, Caio E. C.; MALAQUIAS, José Bruno; CAMILO, Erasnilson Vieira; MALASPINA, Osmar; SILVA-ZACARIN, Elaine C. M.. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized Apis mellifera. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-1, 1 mar. 2019.

TAKEMOTO, Jon Y.; WEGULO, Stephen N.; YUEN, Gary Y.; STEVENS, Julie A.; JOCHUM, Charlene C.; CHANG, Cheng-Wei T.; KAWASAKI, Yukie; MILLER, Gene W.. Suppression of wheat Fusarium head blight by novel amphiphilic aminoglycoside fungicide K20. **Fungal Biology**, [S.L.], v. 122, n. 6, p. 465-470, jun. 2018.

TARBÆK, Sofie M.R.; ANDERSEN, Malene Rask; BROGAARD, Louise; SPINELLI, Anna; RAPSON, Victoria; GLUD, Helena Aagaard; LARSEN, Lars E.; HEEGAARD, Peter M.H.; NAUWYNCK, Hans; SKOVGAARD, Kerstin. Innate antiviral responses in porcine nasal mucosal explants inoculated with influenza A virus are comparable with responses in respiratory tissues after viral infection. **Immunobiology**, [S.L.], v. 227, n. 3, p. 152192, maio 2022.

TSAI, Cheng-Han; WANG, Peng-Yuan; LIN, I-Chan; HUANG, Hu; LIU, Guei-Sheung; TSENG, Ching-Li. Ocular Drug Delivery: role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 2830, 19 set. 2018.

TASHO, Reep Pandi; CHO, Jae Yong. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: a review. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 563-564, p. 366-376, set. 2016.

TRBOJEVICH, Raul A. et al. Comparative study of silver nanoparticle permeation using Side-Bi-Side and Franz diffusion cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 3, p. 1-12, 2016.

TUTTLE, Alexander H.; SALAZAR, Gabriela; COOPER, Ellen M.; STAPLETON, Heather M.; ZYLKA, Mark J.. Choice of vehicle affects pyraclostrobin toxicity in mice. **Chemosphere**, [S.L.], v. 218, p. 501-506, mar. 2019.

U. S. Environmental Protection Agency. (2006). Environmental Protection Agency, Washington, DC.

URTTI A, SALMINEN L. Animal pharmacokinetic studies. In: Mitra AK (ed). Ophthalmic drug delivery systems. New York: Marcel Dekker; 121-136 1993.

US-EPA (United States Environmental Protection Agency) Guidelines for Water Reuse. EPA/600/R-12/004, USEPA Office of Wastewater Management, Washington, United States,2012.

USP. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 39. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

VAN DEN BERG, Henk; GU, Baogen; GRENIER, Beatrice; KOHLSCHMID, Eva; AL-ERYANI, Samira; BEZERRA, Haroldo Sergio da Silva; NAGPAL, Bhupender N.; CHANDA, Emmanuel; GASIMOV, Elkhan; VELAYUDHAN, Raman. Pesticide lifecycle management in agriculture and public health: where are the gaps?. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 742, p. 140598, nov. 2020.

VAN EYK, Armorél D.; BIJL, Pieter van Der. Porcine vaginal mucosa as an in vitro permeability model for human vaginal mucosa. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 305, n. 1-2, p. 105-111, nov. 2005.

VAN SANTVLIET, Luc; LUDWIG, Annick. Determinants of eye drop size. **Survey Of Ophthalmology**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 197-213, mar. 2004.

VERBAAN, F.J.; *et al*. Improved piercing of microneedle arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method. **J. Control. Release**, v.128, p.80-88, 2008.
VERGER, Philippe J. P.; BOOBIS, Alan R.. Reevaluate Pesticides for Food Security and Safety. **Science**, [S.L.], v. 341, n. 6147, p. 717-718, 16 ago. 2013.

VERSTRAELEN, S. et al. Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. Toxicology in Vitro, v. 27, n. 4, p. 1298-1311, 2013.

VIDAL, M. D. F. Produção comercial de frutas na área de atuação do BNB. Caderno Setorial ETENE, Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 6, n.168, jun. , 2021.

WADELL, Cecilia; BJÖRK, Erik; CAMBER, Ola. Nasal drug delivery – evaluation of an in vitro model using porcine nasal mucosa. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 197-206, fev. 1999.

WADELL, Cecilia; BJÖRK, Erik; CAMBER, Ola. Permeability of porcine nasal mucosa correlated with human nasal absorption. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 47-53, jan. 2003.

WANDERLEY, Maria de Nazareth Baudel. O campesinato brasileiro: uma história de resistência. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 25-44, 2014.

WANG, Shouyi; ZHANG, Qingtao; YU, Yurong; CHEN, Ya; ZENG, Song; LU, Ping; HU, Deyu. Residues, dissipation kinetics, and dietary intake risk assessment of two fungicides in grape and soil. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 100, p. 72-79, dez. 2018.

WANG, Xiaohong; LI, Xiaoyu; WANG, Yue; QIN, Yingju; YAN, Bing; MARTYNIUK, Christopher J.. A comprehensive review of strobilurin fungicide toxicity in aquatic species: emphasis on mode of action from the zebrafish model. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 275, p. 116671, abr. 2021.

WEN, Ziyi; MURATOMI, Natsuko; HUANG, Wei; HUANG, Liqun; REN, Jinfeng; YANG, Jennifer; PERSAUD, Yogeeta; LOLOI, Justin; MALLANGADA, Naveen; KUNG, Preston. The ocular pharmacokinetics and biodistribution of phospho-sulindac (OXT-328) formulated in nanoparticles: enhanced and targeted tissue drug delivery. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 557, p. 273-279, fev. 2019.

WENG, Yuhua; LIU, Juan; JIN, Shubin; GUO, Weisheng; LIANG, Xingjie; HU, Zhongbo. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 281-291, maio 2017.

WESTER, R.M., TANOJO, H., MAIBACH, H.I., WESTER, R.CPredicted chemical warfare agent VX toxicity to uniformed soldier using parathion in vitro human skin exposure and absorption. **Toxicol. Appl. Pharmacol**. 168, 149–152., 2000.

WIGHTWICK, Adam M.; BUI, Anh Duyen; ZHANG, Pei; ROSE, Gavin; ALLINSON, Mayumi; MYERS, Jackie H.; REICHMAN, Suzanne M.; MENZIES, Neal W.;

WITTWER, F.; URCULLÚ, F.; CONTRERAS, P.A.; BOHMWALD, H. Concentraciones postmortem de minerales, urea y creatinina en humor acuoso y vítreo en vacas como indicadores de sus concentraciones sanguíneas premortem. Archivos de Medicina Veterinaria, XXIV, Nº 1, 1992.

PETTIGROVE, Vincent; ALLINSON, Graeme. Environmental Fate of Fungicides in Surface Waters of a Horticultural-Production Catchment in Southeastern Australia. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 380-390, 26 out. 2011.

WU, Yiyun; XI, Xican; TANG, Xin; LUO, Deming; GU, Baojing; LAM, Shu Kee; VITOUSEK, Peter M.; CHEN, Deli. Policy distortions, farm size, and the overuse of agricultural chemicals in China. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 115, n. 27, p. 7010-7015, 18 jun. 2018

WUEPPER, David; WIMMER, Stefan; SAUER, Johannes. Is small family farming more environmentally sustainable? Evidence from a spatial regression discontinuity design in Germany. **Land Use Policy**, [S.L.], v. 90, p. 104360, jan. 2020.

XIA, Kaimin; SHEN, Shanshan; GAO, Qun; SHANG, Wei; PAN, Yuanjiang; WU, Jun. Identification of a novel low-level impurity in fungicide pyraclostrobin by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, 2017.

XIE, Zhengang; LIANG, Wenlong; XIONG, Qiuyu; ZHAO, Yanyan; CHENG, Jingli; LI, Xianbin; ZHAO, Jinhao. Acetalated dextran microparticles for the smart delivery of pyraclostrobin to control Sclerotinia diseases. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 291, p. 119576, set. 2022.

YOUNESS, Mohamed; SANCELME, Martine; COMBOURIEU, Bruno; BESSE-HOGGAN, Pascale. Identification of new metabolic pathways in the enantioselective fungicide tebuconazole biodegradation by Bacillus sp. 3B6. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 351, p. 160-168, jun. 2018.

ZAHAIKEVITCH, Everaldo Veres; MACEDO, Luciano Medina; TELLES, Leomara Battisti; BITTENCOURT, Juliana Vitória Messias; ZAHAIKEVITCH, Andréia Gura Veres. Contemporary Public Policies to Strengthen Family Farming in the International Perspective: a bibliometric study. **Journal Of Open Innovation**: Technology, Market, and Complexity, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 8, 5 jan. 2022.

ZHANG, Cheng; WANG, Jun; ZHANG, Shuai; ZHU, Lusheng; DU, Zhongkun; WANG, Jinhua. Acute and subchronic toxicity of pyraclostrobin in zebrafish (Danio rerio). **Chemosphere**, [S.L.], v. 188, p. 510-516, dez. 2017.

ZHANG, Cheng; ZHOU, Tongtong; ZHU, Lusheng; JUHASZ, Albert; DU, Zhongkun; LI, Bing; WANG, Jun; WANG, Jinhua; SUN, Yan'An. Response of soil microbes after direct

contact with pyraclostrobin in fluvo-aquic soil. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 255, p. 113164, dez. 2019.

ZHANG, Lu; YAN, Chengxi; GUO, Qing; ZHANG, Junbiao; RUIZ-MENJIVAR, Jorge. The impact of agricultural chemical inputs on environment: global evidence from informetrics analysis and visualization. **International Journal Of Low-Carbon Technologies**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-16, 22 ago. 2018.

ZHANG, Qingming; LI, Sizhu; SALEEM, Muhammad; ALI, Muhammad Yasir; XIANG, Jiabaihui. Biochar and earthworms synergistically improve soil structure, microbial abundance, activities and pyraclostrobin degradation. **Applied Soil Ecology**, [S.L.], v. 168, p. 104154, dez. 2021.

ZHANG, Xiao; WALLACE, Andrew D.; DU, Pan; KIBBE, Warren A.; JAFARI, Nadereh; XIE, Hehuang; LIN, Simon; BACCARELLI, Andrea; SOARES, Marcelo Bento; HOU, Lifang. DNA methylation alterations in response to pesticide exposure in vitro. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [S.L.], v. 53, n. 7, p. 542-549, 30 jul. 2012.

ZHANG, Yueyang; GOSS, Greg G.. Nanotechnology in agriculture: comparison of the toxicity between conventional and nano-based agrochemicals on non-target aquatic species. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 439, p. 129559, out. 2022.

ZHAO, Enpeng; ILYAS, Ghulam; CINGOLANI, Francesca; CHOI, Jae Ho; RAVENELLE, François; TANAKA, Kathryn E.; CZAJA, Mark J.. Pentamidine blocks hepatotoxic injury in mice. **Hepatology**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 922-935, 20 jul. 2017.

ZHAO, Huanhuan; KONG, Chui-Hua. Elimination of pyraclostrobin by simultaneous microbial degradation coupled with the Fenton process in microbial fuel cells and the microbial community. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 258, p. 227-233, jun. 2018.

ZHAO, Liuqing; ZHANG, Yanwei; WANG, Lu; LIU, Xiaowei; ZHANG, Jingran; HE, Zeying. Stereoselective metabolomic and lipidomic responses of lettuce (Lactuca sativa L.) exposing to chiral triazole fungicide tebuconazole. **Food Chemistry**, v. 371, p. 131209, mar. 2022.

ZHAO, Xiang; CUI, Haixin; WANG, Yan; SUN, Changjiao; CUI, Bo; ZENG, Zhanghua. Development Strategies and Prospects of Nano-based Smart Pesticide Formulation. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 66, n. 26, p. 6504-6512, 27 jun. 2017.

ZHAO, Zixi; SUN, Runxia; SU, Yue; HU, Jiye; LIU, Xiaolu. Fate, residues and dietary risk assessment of the fungicides epoxiconazole and pyraclostrobin in wheat in twelve different regions, China. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 207, p. 111236, jan. 2021.

ZSIKÓ, Stella et al. Methods to evaluate skin penetration in vitro. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, p. 19, 2019.

ZUBROD, Jochen P.; BUNDSCHUH, Mirco; ARTS, Gertie; BRÜHL, Carsten A.; IMFELD, Gwenaël; KNÄBEL, Anja; PAYRAUDEAU, Sylvain; RASMUSSEN, Jes J.; ROHR, Jason; SCHARMÜLLER, Andreas. Fungicides: an overlooked pesticide class?. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 53, n. 7, p. 3347-3365, 5 mar. 2019.